



Rôle d'ETTIN/ARF3 dans le développement du carpelle chez *Arabidopsis thaliana*

Amélie Andres Andres-Robin

► To cite this version:

Amélie Andres Andres-Robin. Rôle d'ETTIN/ARF3 dans le développement du carpelle chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2011. Français. NNT : 2011ENSL0687 . tel-00683741

HAL Id: tel-00683741

<https://theses.hal.science/tel-00683741>

Submitted on 29 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présenté en vue d'obtenir le grade de docteur de

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

par Amélie ANDRES-ROBIN

Spécialité : Sciences de la Vie

Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes

Ecole Doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Rôle d'*ETTIN/ARF3* dans le développement du carpelle chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse soutenue le 18 novembre 2011 devant le jury composé de :

Mr Christian CHEVALIER, INRA Bordeaux	rapporteur
Mr Jérôme PELLOUX, Université de Picardie-Jules Verne	rapporteur
Mme Samantha VERNHETTES, INRA Versailles	examineur
Mr Arezki BOUDAUD, ENS Lyon	examineur
Mme Françoise MONEGER, ENS Lyon	directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier Jan de m'avoir accueillie au laboratoire RDP.

Je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté de lire, de juger et de discuter de mon travail de thèse.

Je souhaite également remercier Bénédicte DURAND et Grégory MOUILLE, membres de mon comité de thèse, pour avoir suivi mon travail et pour m'avoir donné de précieux conseils. Grégory, merci également pour ton accueil chaleureux à Versailles et pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la FTIR.

Un grand merci à Fanfan, de m'avoir prise en tant que stagiaire malgré mes 8 mois de grossesse et de m'avoir gardé ensuite en thèse. Merci d'avoir pris le temps de discuter avec moi, de me conseiller et surtout, merci de m'avoir donné beaucoup de ton temps pendant ce dernier mois assez difficile.

Je remercie chaleureusement tous les membres des deux équipes dont j'ai fait partie. Charlie et Jan, merci de m'avoir accueillie dans vos équipes. Je voudrais particulièrement remercier Frédérique pour toutes les hybridations *in situ*, Sandrine pour sa ténacité dans la mise au point de la ChIP (un jour, peut-être) et mes deux stagiaires : Ludivine et Laetitia pour leur travail et leur sympathie.

Merci à tous les membres du RDP pour leur aide, leur bonne humeur et leur coup de gueule (un peu d'animation c'est sympa). Merci à Claudya et Hervé pour leur aide au quotidien: sans vous rien ne serait possible. Merci beaucoup à Isabelle, Priscilla et Alexis pour avoir pris soin de mes plantes. Merci à Laetitia et Stéphanie pour leur soutien administratif.

Merci à mes voisins de bureau : Coralie, Sandrine, Valérie et Philippe; j'ai passé de très bons moments avec vous, juste assez de sérieux mais pas trop.

Merci également à mes voisins de paillasse : Charlie, Mike, Pierre, Géraldine, Sophy, Frédérique, Sandrine, Aurélie C, Aurélie V, Coralie, Laetitia et Valérie pour nos fous rires et vos stylos.

Merci aux membres plus ou moins permanents du wagon de 11h30 pour la cantine : Annick, Anne-Evodie, Claudya, Ghislaine, Laetitia, Peter et Thomas.

Merci aux filles et gars du thé/goûter : Aurélie², Coralie, Géraldine, Ghislaine, Magalie, Patoche, Sandrine, Sophy, Sylvie, Valérie pour nos discussions passionnantes (poules, cheval, cuisine,).

Merci à toute ma famille pour avoir cru en moi : à mes parents et mes beaux-parents pour leur aide et leur soutien au quotidien, à ma sœur qui me fait souvent rire et qui a décrété que j'étais gynécologue pour fleur (une poète dans la famille), à Karine pour nos soirées choucroute, à ma maman et à mon papa pour avoir toujours été là pour moi. Un grand merci à mon mari qui m'a aidée et soutenue dès le premier jour où j'ai repris mes études : il m'a encouragé quand j'ai dit : « finalement je ferais bien une licence » puis « tiens c'est sympa, pourquoi pas un Master? » et enfin « finalement une thèse, c'est bien aussi ». Enfin, un immense merci à mon fils d'être aussi indulgent avec sa maman et de me dire aussi souvent qu'il m'aime.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ARN : acide ribonucléique

BSA : sérum albumine bovine

CaMV35S : "Cauliflower Mosaic Virus"

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : désoxy nucléotide triphosphate

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène-diamine-tetraacétique

GUS : β -glucuronidase

HA : hemagglutinine

LB : Milieu Luria-Bertani

MS : sels Murashige et Skoog

Pb : paire de base

PCR : "polymerase chain reaction"

RNase : ribonucléase

RT-PCR : "reverse transcription- polymerase chain reaction"

SDS : sodium dodécyl sulfate

Taq : thermophilus aquaticus

Ta-siRNA : trans-acting RNA silencing

TBS-T: "tris buffered saline-tween"

T-DNA : ADN de transfert

Convention d'écriture :

GENE

PROTEINE

Mutant

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	
I- Le gynécée d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
A- Structure du gynécée d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1- Le stigmate	2
2- Le style	2
3- L'ovaire	3
4- Le gynophore	3
B- Le développement du gynécée d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	3
C- Auxine et gynécée	5
II- L'auxine	6
A- La biosynthèse d'auxine	6
1- La voie de biosynthèse d'auxine dépendante du tryptophane	6
1-1- La voie de l'indole 3-acétaldoxime (IAOx)	6
1-2- La voie de l'indole 3-acétamide (IAM)	8
1-3- La voie du tryptamine (TAM)	8
1-4- La voie de l'acide indole 3-pyruvique (IPA)	10
2- La voie de biosynthèse d'auxine indépendante du tryptophane	11
B- Auxine libre et auxine conjuguée	11
C- Le transport de l'auxine	13
1- L'influx d'auxine	13
2- L'efflux d'auxine	14
D- La signalisation de l'auxine	16
1- Les Aux/IAA et les ARF sont les acteurs de la signalisation de l'auxine	16
2- La voie du protéasome est nécessaire à la réponse à l'auxine	18
E- Auxine et paroi	19

II- La paroi cellulaire	21
A- La pectine	21
B- Les pectines méthylestérases (PME) et leurs inhibiteurs (PMEI)	23
C- Exemples d'enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire	25
1- Les pectates lyases	25
2- Les "arabinogalactan protein" (AGP)	26
3- Les Expansines	27
 OBJECTIF DE LA THESE	 30
 RESULTATS ET DISCUSSIONS	 32
 I- Identification des cibles d'ETT et d'ARF4	 33
A- Recherche de motifs conservés	35
B- Caractérisation de plantes dont l'expression d'ETT est modifiée	37
1- Patron d'expression d'ETT et d'ARF4 au cours du développement floral	37
2- Caractérisation moléculaire des lignées utilisées	38
3- Caractérisation phénotypique des lignées utilisées	39
C- ETT et le remodelage de la paroi	42
1- Le patron d'expression des gènes cibles directes putatifs impliqués dans le remodelage de la paroi	42
2- Composition de la paroi chez les mutants dont le niveau d' <i>ETT</i> est modifié	42
3- ETT et la déméthylestérification des pectines	43
4- ETT et la croissance	44
D- ETT et la signalisation de l'auxine	47
1- ETT active <i>BT2</i> et inhibe <i>IAA6</i> et <i>IAA17</i>	48
2- Les patrons d'expression de <i>BT2</i> , d' <i>IAA6</i> et d' <i>IAA17</i> dans le gynécée	49
3- ETT et la réponse à l'auxine	49
4- La surexpression d' <i>ETT</i> ne semble pas restaurer le phénotype du mutant <i>axr3-3</i>	50

E- ARF4 régule-t-il les mêmes gènes cibles qu'ETT ?	52
1- Obtention d'une lignée inductible surexprimant <i>ARF4</i>	52
2- Interaction protéique entre ETT et ARF4 ?	52
II- Auxine et gynécée	54
A- L'auxine est-elle synthétisée à l'apex du gynécée ?	55
B- L'auxine est-elle pompée de haut en bas ?	56
C- Comment mesurer la quantité d'auxine <i>in planta</i> ?	57
D- Discussion	62
III- Etude fonctionnelle de CRABS CLAW	65
A- Interacteurs de CRABS CLAW	66
B- La fonction des domaines protéiques de CRABS CLAW	67
C- Motifs reconnus par la protéine CRABS CLAW	68
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	70
MATERIELS ET METHODES	72
A- Matériel végétale et conditions de culture	73
1- Matériel végétal	73
2- Milieux et conditions de culture	74
B- Croisements	75
C- Traitement à l'auxine	75
D- Préparation de la construction <i>p35S::ARF4-GR</i>	75
E- Transformation des plantes	76
F- Obtention de gènes tronqués par mutagenèse dirigée	77
G- Induction à la Dexamethasone	77
H- Extraction d'ARN	78

I- RT-PCR quantitative	78
J- Complementation bimoléculaire de fluorescence (BiFC)	79
K- Analyse de la composition de la paroi par spectroscopie infra-rouge à transformé de Fourier (FTIR)	79
L- Hybridation <i>in situ</i>	80
M- Immunolocalisation	81
 REFERENCES	 82
 ANNEXES	 97

INTRODUCTION

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 1 : Structure du gynécée d'*Arabidopsis thaliana*.

(A) Vue en microscopie électronique à balayage d'un gynécée d'*A. thaliana* au stade 13 (modifié de Ferrandiz et al., 2010). (B) Coupe transversale au niveau des ovaires d'un gynécée d'*A. thaliana* (modifié de Balanza et al., 2006). Les trois axes de polarité ainsi que les différents tissus sont indiqués sur la figure.

Les angiospermes, ou plantes à fleur, sont classées et caractérisées par Linné dès le 18^{ème} siècle grâce à leur structure reproductrice : la fleur. La fleur comprend quatre types d'organes floraux qui s'organisent en verticilles concentriques les deux premiers sont stériles ce sont les sépales et les pétales et renferment les organes reproducteurs male, les anthères et femelle, le gynécée. C'est la présence du gynécée, renfermant les ovules, qui est à l'origine du nom angiosperme qui signifie en grecque récipient (*angeion*) à graines (*sperma*). Dans l'équipe nous nous intéressons plus particulièrement au développement du gynécée chez une plante modèle en biologie végétale : *Arabidopsis thaliana*.

I- Le gynécée d'*Arabidopsis thaliana*

A- Structure du gynécée d'*Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gynécée ou pistil positionné au centre de la fleur est formé de deux carpelles fusionnés, on appelle ce phénomène la syncarpie. Après fécondation le pistil un fruit sec qu'on appelle silique. A maturité, la silique sèche et libère les graines en s'ouvrant par deux fentes de déhiscence. Le gynécée est composé, selon l'axe de polarité apico-basal, de quatre régions distinctes : le stigmate, le style, l'ovaire et le gynophore (Figure 1A) (Balanza et al., 2006; Ferrandiz C, 2010).

1- Le stigmate

A l'apex du gynécée, le stigmate est composé d'une seule couche cellulaire allongée. Ces cellules forment les papilles stigmatiques. Elles sont spécialisées dans la réception, l'hydratation et la germination du grain de pollen qui contient les gamètes males.

2- Le style

Sous le stigmate, le style forme un cylindre autour du tissu de transmission. Le tissu de transmission est composé d'un groupe de petites cellules entourées d'une importante matrice extracellulaire riche en polysaccharides de type arabinogalactanes (Lehner et al., 2010). Le tissu de transmission permet la croissance du tube pollinique du style à l'ovaire. L'épiderme du style est composé de larges cellules rectangulaires orienté selon l'axe apico-basale et de stomates.

3- L'ovaire

Sous le style, l'ovaire forme la majeure partie du gynécée. Il renferme les ovules qui contiennent les gamètes femelles. Il est le lieu où se déroule la fécondation. L'ovaire est formé de deux compartiments séparés par le septum. Une coupe transversale de l'ovaire permet de distinguer plusieurs tissus et met en évidence deux axes de polarité : l'axe médio-laréral et l'axe abaxial-adaxial (Figure 1B).

Le long de l'axe médio-latéral : les valves au nombre de deux sont placées en position latérale. Les valves protègent les ovules puis après la fécondation les graines. Elles sont composées de six couches cellulaires : l'épiderme externe ou exocarpe composé de larges cellules et de stomates, le mésocarpe formé de trois couches cellulaires et enfin l'endocarpe composé de deux couches cellulaires : une couche de petites cellules alignées (*enb*) et une couche de large cellule formant l'épiderme interne (*ena*). A l'extrémité des valves, une colonne de petites cellules forment un pli longitudinal appelé marge des valves. Chaque marge des valves est formée de deux couches cellulaires impliquées dans la déhiscence du fruit. En position médiale, l'ovaire est divisé en deux compartiments par le replum et le septum. Le replum en position abaxiale contient deux principaux vaisseaux vasculaires longitudinaux approvisionnant le tissu placentaire. Les cellules externes du replum sont très allongées et de forme rectangulaires. Le septum, en position adaxiale, forme une cloison qui sépare l'intérieure de l'ovaire en deux loges et présente en son centre le tissu de transmission. A la jonction du septum et des valves, les ovules, également en position adaxiale, se développent. Les ovules sont composés du nucelle qui contient le sac embryonnaire, deux téguments qui entourent le nucelle et le funicule qui relie l'ovule au tissu placentaire.

4- Le gynophore

A la base, le gynophore forme une tige courte qui soutient le gynécée et le relie au pédicelle.

B- Le développement du gynécée d'*Arabidopsis thaliana*

Ces différents tissus se forment au cours de la morphogenèse de la fleur. L'analyse détaillée au microscope électronique à balayage de la fleur et du fruit de l'écotype Landsberg (Ler) d'*A. thaliana* a permis à Smyth et ses collaborateurs de découper le développement de la fleur en douze stades et le développement du fruit en huit stades, du stade 13 au stade 20 (Figure 2) (Smyth et al., 1990).

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 2 : Stades de développement de la fleur et du fruit d'Arabidopsis.

(A-C, E, G, I-M) Images en microscopie électronique à balayage (MEB), (D, F et H) coupes longitudinales de gynécées et (N à T) photos prises à la loupe binoculaire; (A) méristème d'inflorescence (i) à partir duquel se développent des méristèmes floraux. Les stades sont indiqués sur les boutons floraux. Les faces abaxiale (ab) et adaxiale (ad) de la fleur au stade 4 sont indiquées et l'axe médial (m) et latéral (l) de la fleur au stade 5 est indiqué; (B) gynécée au stade 6 entourée des

étamines, la flèche indique le sillon central à partir duquel le gynécée va s'invaginer; (C) gynécée au stade 7; (D) coupe longitudinale d'un gynécée au stade 7; (E) gynécée au stade 8; (F) coupe longitudinale d'un gynécée au stade 8; (G) gynécée au stade 9, la flèche indique le style en formation; (H) coupe longitudinale d'un gynécée au stade 9; (I) gynécée au stade 10, la flèche indique le style en formation; (J) gynécée au stade 11, (K) 12, (L) 13 et (M) 14; (N) photographie d'un fruit au stade 15, (O) 16, (P) au début (à gauche) et à la fin (à droite) du stade 17, (Q) stade 18, (R) stade 19, (S) début du stade 20 et (T) à la fin du stade 20. sty: style, va: valve, rep: replum, gyn: gynophore. La barre d'échelle représente (G, I) 25µm, (J) 50µm, (K-L) 100µm, (M-N) 500µm et (O-T) 1mm (d'après Roeder and Yanofsky, 2006).

L'apparition de la fleur, au **stade 1**, débute par un gonflement à la périphérie du méristème apical d'inflorescence. Au **stade 2**, le primordia floral s'élargi et commence à se séparer du méristème d'inflorescence. Les primordia de sépales émergent sur les côtés du méristème floral au **stade 3**. Au cours du **stade 4**, les sépales grandissent jusqu'à recouvrir partiellement le méristème floral. Au **stade 5**, les primordia de pétales et d'étamines s'initient. A la fin du stade 5, le méristème floral s'élargi et forme un dôme ovale à partir duquel se développe le gynécée. Quand les sépales recouvrent le méristème floral, au **stade 6**, le gynécée commence à se développer, les cellules du centre du dôme s'invaginent créant un sillon central. Au **stade 7**, les cellules de la périphérie du dôme croissent majoritairement par élongation cellulaire et forment un cylindre creux. Le gynécée continu de croître au cours du **stade 8** et la formation du septum s'initie. Au **stade 9**, l'apex du gynécée commence à se fermer. Au stade 9 tardif, l'apparition de cellules rondes à l'apex du gynécée suggèrent la différenciation des papilles stigmatiques. Le septum est formé et les primordia d'ovules se mettent en place. Au **stade 10**, le gynécée continu à croître et le tube se ferme à son extrémité apicale. Au **stade 11**, les papilles stigmatiques recouvrent le stigmat et l'épiderme du style commence à se différencier. Au cours du **stade 12**, le style, les valves, les marges des valves et le replum sont morphologiquement distincte et le tissu de transmission se différencie au sein du septum. Le **stade 13** également appelé anthèse est caractérisé par l'ouverture de la fleur et son autopolinisation. A ce stade, les ovules sont matures et sont prêtes à être fécondés et les fentes de déhiscence des anthères s'ouvrent. Au **stade 14**, les étamines s'étendent au-dessus du stigmat. Le stigmat reçoit les grains de pollen qui germent. Les tubes polliniques croissent à l'intérieur du tissu de transmission jusqu'aux ovules qu'ils fécondent. Du **stade 15** au stade 17, le fruit s'allonge. Au cours du **stade 16**, les sépales, les pétales et les étamines se détachent et tombent. A la fin du **stade 17**, le fruit a terminé son élongation. Au **stade 18**, le fruit devient jaune et commence à sécher. Au **stade 19**, le fruit sec devient marron et les valves se séparent du fruit. Au **stade 20**, les graines se détachent et tombent, seules le replum et le septum secs restent attachés à la plante.

C- Auxine et gynécée

La morphogenèse du gynécée est sous le contrôle d'une régulation transcriptionnelle précise faisant intervenir de nombreux gènes, mais également des hormones comme par exemple l'auxine. Ainsi, des mutants présentant une altération dans le transport polarisé d'auxine tel que *pin1* ou dans la réponse à l'auxine tel que *ett/arf3* ou *arf5* montrent des défauts dans la mise en place de la polarité apico-basale du gynécée. Le gynécée de ces mutants possède une forte réduction des ovaires au profit des régions apicale et basale (Bennett et al., 1996; Okada et al., 1991; Przemeck et al., 1996; Sessions et al., 1997). Ce qui suggère que l'auxine agirait dans l'établissement de la polarité apico-basale du gynécée. Des analyses du transcriptome du tissu stigmatique du riz montrent que de nombreux gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine sont fortement exprimé (Li et al., 2007). De plus, une étude détaillée de la distribution de l'auxine dans le stigmate et le style de *Nicotiana tabacum* montre un niveau d'auxine libre élevé dans le stigmate et le style au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance du tube pollinique (Chen and Zhao, 2008). Ces données suggèrent que la distribution de l'auxine joue également un rôle important dans la pollinisation. Le double mutant *arf6 arf8*, altéré dans la réponse à l'auxine, présente des fleurs dont le développement s'interrompt au stade 12, les organes floraux cessent de croître, les fleurs restent fermées et ne produisent pas de graines (Nagpal et al., 2005). Ce phénotype suggère que l'auxine serait impliquée dans la maturation de la fleur. Ainsi l'auxine jouerait un rôle important dans la morphogenèse du gynécée.

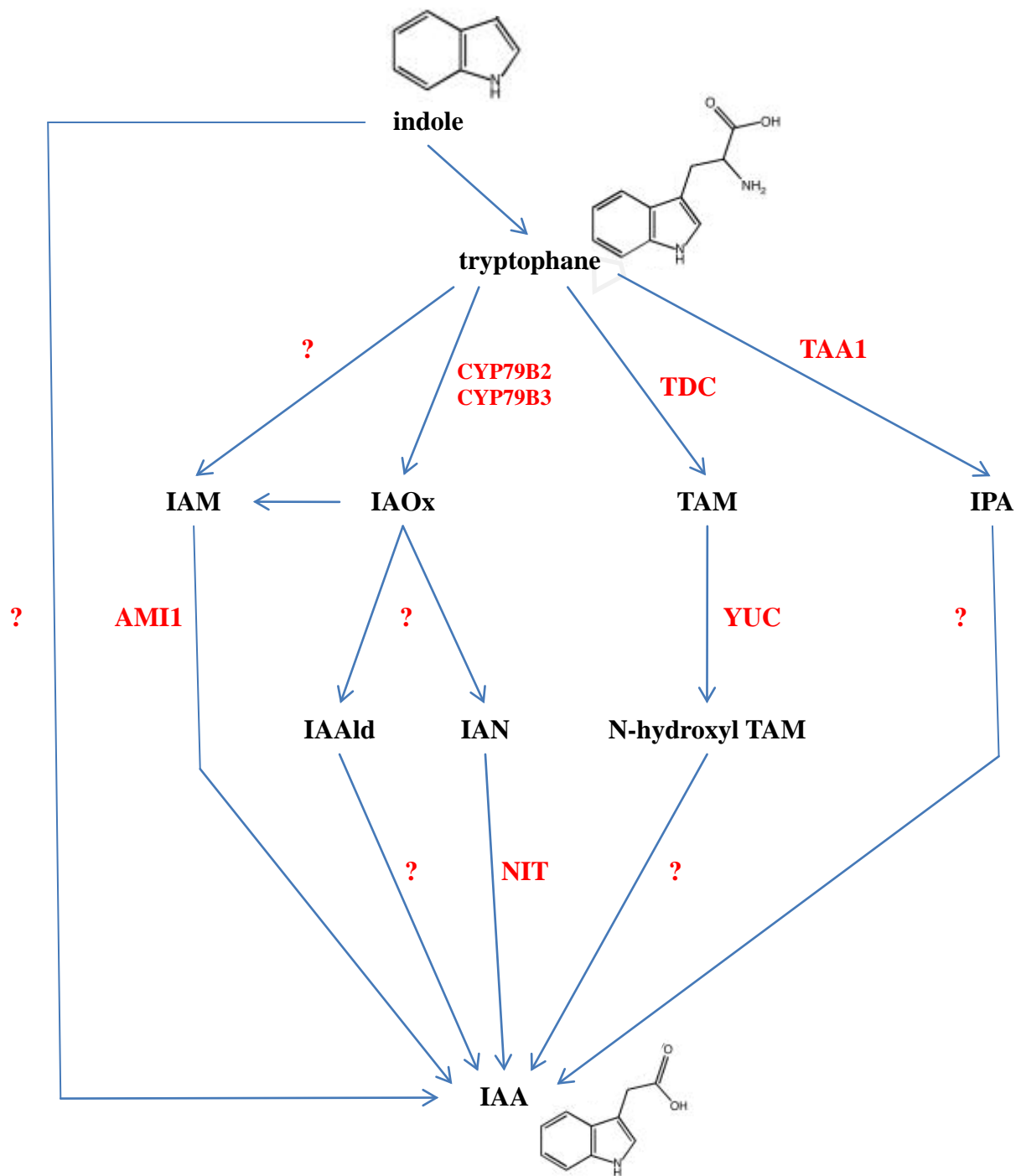


Figure 3 : Schéma des différentes voies de biosynthèse d'auxine (IAA).

IAA : acide indole-3-acétique, TAM : tryptamine, IAOx : indole 3-acétaldoxime, IPA : indole 3-pyruvique, IAM : indole 3-acétamide, IAN : indole 3-acétonitrile, IAAld : indole 3-acétaldéhyde, *iaaM* : tryptophane-2-monooxygénase, CYP79B2/3 : CYTOCHROME P79 B2/3, NIT : NITRILASE, YUC : YUCCA, TDC : TRYPTOPHANE DECARBOXYLASE, TAA1 : TRYPTOPHANE AMINOTRANSFERASE1, AMI1 : AMIDASE1.

II- L'auxine

L'auxine (acide indole-3-acétique ou IAA) est une hormone végétale indispensable au développement de la plante. Darwin observe, vers la fin du 19^{ème} siècle, que la courbure des coléoptiles d'avoine vers la lumière est abolie lorsque l'apex du coléoptile est coupé ou recouvert d'un capuchon opaque. Il constate que la zone de courbure du coléoptile se situe légèrement en-dessous de l'apex du coléoptile. Il en conclut qu'un signal de croissance est produit au sommet du coléoptile, voyage jusqu'à la zone de croissance et cause une croissance plus rapide de la face ombrée du coléoptile par rapport à la face illuminée. Darwin est le premier à suggérer la présence d'une substance chimique modifiant la croissance de la plante. Plus tard des expériences montrent que le bout du coléoptile séparé de la tige par un bloc de gélose continu de se courber vers la lumière alors que cette courbure est abolie lorsque le coléoptile est séparé de la tige par un bloc de mica, de platine ou de beurre de cacao. Ils en déduisent que le signal n'est ni électrique ni liposoluble mais hydrosoluble. Sa structure chimique a été élucidée en 1931 par Kogl et Haagen-smit. Cette hormone est produite à partir d'indole et régule de nombreux processus développementaux. Elle est notamment impliquée dans le développement du gynécée (Nemhauser et al., 2000).

6

A- La biosynthèse d'auxine

Deux grandes voies de biosynthèse d'auxine ont été proposées, la première dépendante du tryptophane (Trp) et la seconde indépendante du Trp (Cohen et al., 2003). Au sein de la première voie, on compte quatre voies indépendantes produisant de l'auxine à partir de tryptophane : la voie de l'indole 3-acétaldoxime (IAOx), la voie du tryptamine (TAM), la voie de l'acide indole 3-pyruvique (IPA) et la voie de l'indole 3-acétamide (IAM) (Figure 3).

1- La voie de biosynthèse d'auxine dépendante du tryptophane

1-1- La voie de l'indole 3-acétaldoxime (IAOx)

Chez *A. thaliana*, deux enzymes de la famille des cytochromes, les CYP79B2 et CYP79B3 sont connues pour participer à la synthèse d'IAA via la conversion du Trp en indole 3-acétaldoxime (IAOx). En effet, des expériences ont montré que la protéine CYP79B2 est capable *in vitro* de convertir le Trp en IAOx (Hull et al., 2000). De plus, *in planta* la production d'IAA augmente lorsque le gène *CYP79B2* est sur-exprimé et le phénotype de

cette plante présente un hypocotyle allongé et des cotylédons épinastiques, phénotype caractéristique d'une sur-production d'IAA (Zhao et al., 2002). Contrairement à la plante sur-exprimant *CYP79B2*, le double mutant *cyp79b2 cyp79b3* possède un niveau d'IAA réduit (Zhao et al., 2002). L'indole 3-acétonitrile (IAN), proposé pour être un intermédiaire dans la voie de biosynthèse d'IAA, est également présent en quantité plus importante chez une plante sur-exprimant *CYP79B2* que chez une plante sauvage (Zhao et al., 2002). Ces données suggèrent qu'IAN est un dérivé d'IAOx. Des études ont montré que quatre gènes *NIT1*, *NIT2*, *NIT3* et *NIT4* codant des nitrilases, sont capables d'hydrolyser l'IAN en IAA lorsqu'ils sont exprimés chez *Escherichia coli*. De plus, le mutant *nit1* est insensible à l'apport exogène d'IAN mais non d'IAA (Normanly et al., 1997). L'IAOx semble être converti en IAN puis transformé en IAA par des nitrilases (NIT). Chez des plantules mutantes *superroot2 (sur2)*, où l'IAOx est sur-accumulée, la présence d'indole 3-acétaldéhyde (IAAld) est plus importante que chez une plantule sauvage (Barlier et al., 2000). L'IAAld serait donc un autre dérivé intermédiaire entre l'IAOx et l'IAA. De récentes analyses sur le double mutant *cyp79b2 cyp79b3* suggèrent que l'indole 3-acétamide (IAM) serait également un intermédiaire dans la transformation de l'IAOx en IAA. En effet, chez le double mutant *cyp79b2 cyp79b3* le niveau d'IAM est réduit et l'apport exogène d'IAOx restaure partiellement le niveau d'IAM. Par contre, les protéines impliquées dans la production d'IAM à partir d'IAOx ne sont pas connues (Sugawara et al., 2009).

Les *CYP79B2* et 3 semblent constituer la seule voie de production d'IAOx puisque chez le double mutant *cyp79b2 cyp79b3*, le niveau d'IAOx n'est pas détecté. Cependant, cela ne représente probablement pas la voie majoritaire de biosynthèse d'IAA. En effet, le phénotype du double mutant *cyp79b2 cyp79b3* est faible en comparaison des phénotypes de mutants affectés dans la signalisation ou le transport de l'auxine, comme nous le verrons par la suite. De façon intéressante, l'IAOx n'a pas été détecté chez le riz, le maïs ou le tabac mais uniquement chez des *Brassicaceae* comme *A. thaliana*, *Brassica napus* et *Sinapis alba* (Bak et al., 1998). L'IAOx n'est pas seulement un intermédiaire de la synthèse d'IAA, mais semble également impliqué dans la synthèse de 3-indolylmethyl-glucosinolate (IG) et de camalexin (CL) (Bak et al., 2001; Glawischnig et al., 2004). L'IG est un métabolite qui dissuade les herbivores tandis que la CL est une phytoalexine, substance produite en réponse à une attaque de pathogène (Halkier and Gershenzon, 2006; Nafisi et al., 2007).

1-2- La voie de l'indole 3-acétamide (IAM)

Les pathogènes des plantes, comme les bactéries du genre *Pseudomonas*, utilisent la Trp-2-monooxygenase (iaaM) pour convertir le Trp en indole-3-acétamide (IAM), lui-même hydrolysé en IAA par une hydrolase l'iaaH (Comai and Kosuge, 1982; Kosuge et al., 1966). Pendant longtemps, on pensait que cette voie de biosynthèse d'IAA était restreinte aux bactéries, mais une étude récente a montré la présence d'IAM chez quatre plantes : Arabidopsis, le riz, le maïs et le tabac (Sugawara et al., 2009). Cette voie de biosynthèse a été bien caractérisée chez les bactéries mais elle reste mal définie chez les plantes. Lorsqu'une plante surexprime le gène bactérien iaaM, elle présente un hypocotyle allongé et des cotylédons épinastriques (Romano et al., 1995). L'iaaM convertit le Trp en IAM et la plante surexprimant l'iaaM présente un phénotype de surexpression d'IAA, ce qui suggère que la plante possède une enzyme capable d'hydrolyser l'IAM pour produire de l'IAA. De plus, une amidase AMI1 identifiée chez *A. thaliana* est capable d'hydrolyser *in vitro* l'IAM en IAA (Pollmann et al., 2009). La quantité d'IAM est réduite chez un double mutant *cyp79b2 cyp79b3* et l'application d'IAM restaure le phénotype du double mutant *cyp79b2 cyp79b3* (Sugawara et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les gènes *CYP79B2* et *CYP79B3* sont impliqués dans la production d'IAM. De plus, la synthèse d'IAM à partir d'IAOx marqué a été mise en évidence *in vivo*, cette synthèse étant indépendante de la synthèse d'IAN (Sugawara et al., 2009). Ces données suggèrent que l'IAM est un dérivé de l'IAOx.

8

Comme nous l'avons vu précédemment, Sugawara et ses collaborateurs mettent en évidence la présence d'IAM chez le riz, le maïs et le tabac alors que ces plantes ne possèdent apparemment pas d'homologue des gènes *CYP79B2* et *CYP79B3* et de plus, ils ne détectent pas d'IAOx chez ces plantes (Sugawara et al., 2009). Ces données suggèrent que l'IAM serait également produite indépendamment de l'IAOx.

1-3- La voie du tryptamine (TAM)

La première étape de cette voie de biosynthèse est la modification du Trp aboutissant au tryptamine (TAM). Chez *A. thaliana*, les enzymes responsables de cette transformation ne sont pas connues alors que chez d'autres espèces comme le riz (*Oryza sativa*), la TRP DECARBOXYLASE (TDC) a été montrée comme capable de produire du TAM à partir de Trp (Kang et al., 2007). La TAM serait ensuite convertie en N-hydroxyltryptamine (N-hydroxyl TAM), conversion catalysée par les gènes de la famille *YUCCA* (Kim et al., 2007; Zhao et al., 2001). Cette famille de gènes code des flavines monooxygenases et compte chez *A. thaliana* onze membres qui sont différemment exprimés au cours du développement de la

plante (Cheng et al., 2006, 2007). Le mutant *yuc1D*, sur exprimant le gène *YUCCA1*, possède un phénotype connu pour être associé à une surproduction d'IAA, notamment un hypocotyle rallongé, une surproduction de racines latérales, des feuilles épinastiques et une augmentation de la dominance apicale chez la plante mature (Zhao et al., 2001). Le mutant *yuc1D* contient 50% d'IAA libre de plus que chez la plante sauvage, ce qui suggère que le gène *YUC1* est impliqué dans la production d'IAA. La surexpression chez un mutant *yuc1D*, du gène bactérien *IAAL* codant une enzyme qui diminue la quantité d'IAA libre, restaure partiellement un phénotype sauvage. Afin de tester si l'augmentation du niveau d'auxine chez le mutant *yuc1D* est dépendante du Trp, Zhao et ses collaborateurs ont fait pousser des plantes sauvage et mutante *yuc1D* sur un milieu contenant un homologue toxique du Trp le 5-méthyl Trp (5-MT) qui inhibe la biosynthèse du Trp et perturbe la fonction des protéines dans lesquelles il est incorporé (Zhao et al., 2001). En présence de 5-MT, les plantules mutantes *yuc1D* présentent un développement de racines adventives au niveau de l'hypocotyle, phénotype également observé sur des plantules sauvages ayant poussé sur un milieu nutritif additionné de 5-méthyl-IAA. On peut donc supposer que *YUC1* est impliqué dans la production de 5-méthyl-IAA à partir de 5-MT (Zhao et al., 2001). Ces résultats suggèrent que le mutant *yuc1D*, surexprimant le gène *YUC1*, produit une grande quantité d'IAA via la voie dépendante du Trp. Etant donné qu'une surexpression des autres membres de la famille *YUCCA* produit le même phénotype, on peut conclure que les protéines *YUCCA* ont toutes une action similaire (Cheng et al., 2006; Zhao et al., 2001). De plus, ces gènes semblent redondants du fait que les simples mutants n'ont pas de phénotype. Cependant lorsque deux ou plusieurs gènes *YUCCA* sont simultanément inactifs, on constate de graves défauts développementaux. Par exemple, le double mutant *yuc1 yuc4* produit des fleurs anormales dont les organes mâles et femelles sont non fonctionnels. Ce phénotype est restauré par l'expression du gène bactérien de biosynthèse d'auxine *iaaM* sous le contrôle du promoteur de *YUC1* (Cheng et al., 2006). Les défauts développementaux observés chez des multiples mutants *yucca* sont très proches de ceux observés chez des mutants affectés dans la signalisation ou le transport de l'auxine. Par exemple, le quadruple mutant *yuc1 yuc4 yuc10 yuc11* présente des défauts dans la mise en place de la partie basale de l'embryon au cours de l'embryogenèse, malformation également observée chez le mutant *monopteros/arf5*, dont le gène code un facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'auxine (Cheng et al., 2006, 2007; Hardtke and Berleth, 1998). Contrairement aux gènes *CYP79B2* et *3* uniquement détectés chez les *Brassicaceae*, des gènes homologues aux gènes *YUCCA* ont été identifiés chez de nombreuses espèces où ils codent des protéines jouant un rôle similaire dans la

biosynthèse de l'auxine. Par exemple chez le pétunia, la surexpression de *FLOOZY*, conduit à une surproduction d'IAA (Tobena-Santamaria et al., 2002).

En résumé, la surexpression des gènes YUCCA conduit à une surproduction d'IAA alors qu'une perte de fonction induit des défauts développementaux restaurés par une production d'IAA *in situ*. Les protéines YUCCA catalysent donc la production d'IAA. Cependant, les mécanismes biochimiques restent à élucider.

1-4- La voie de l'acide indole 3-pyruvique (IPA)

Il y a une vingtaine d'années, l'application de tryptophane radioactif sur des cellules de tomate a permis l'identification d'acide indole 3-pyruvique (IPA) et d'IAA radio marqué suggérant que l'IPA est impliqué dans la voie de biosynthèse de l'IAA dépendante du Trp (Cooney and Nonhebel, 1989). Ce n'est que récemment que la protéine capable de catalyser la conversion du Trp en IPA a été identifiée chez *A. thaliana*. Plusieurs études ont montré en effet, que la TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1) est capable *in vitro* de transformer le Trp en IPA (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008). Plusieurs études indépendantes ont montré que le gène *TAA1* est responsable des mutations *shade avoidance 3 (sav3)*, *weak ethylene insensitive 8 (wei8)* et *transport inhibitor response 2 (tir2)* (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008; Yamada et al., 2009). Le phénotype du mutant *sav3* montre un défaut d'élongation de l'hypocotyle à l'obscurité restauré par l'application soit d'une forte concentration de picloram, une auxine synthétique, soit d'IPA (Tao et al., 2008). Les plantules *sav3*, *wei8* et *tir2* contiennent moins d'IAA libre que les plantules sauvages et sont hypersensibles au 5-méthyl Trp, un analogue du Trp qui inhibe sa synthèse, de plus, l'étude du mutant *tir2* montre que son phénotype hypocotyle court peut être restauré par l'apport d'IPA ou d'IAA (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008; Yamada et al., 2009). Ces données suggèrent que l'IAA est bien synthétisée à partir de Trp via l'IPA

Cette voie de biosynthèse d'auxine semble impliquée dans la réponse à des stimuli extérieurs tels que la température, l'obscurité et la présence d'éthylène. La protéine TAA1 catalyse la conversion du Trp en IPA. Etant donné que la surexpression de *TAA1* ne provoque pas de phénotype de surexpression d'IAA cette étape ne semble pas être une étape limitante de la biosynthèse d'IAA (Tao et al., 2008; Zhao et al., 2001).

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 4 : La voie de synthèse du tryptophane chez *Arabidopsis thaliana*.

L'IAA peut être synthétisée via une voie dépendante du Trp et une voie indépendante du Trp. Les différents mutants *trp* et les plantes transgéniques contenant un ARN antisens sont positionnés sur la voie de biosynthèse du Trp allant du chorismate au Trp. Les gènes codant les enzymes nécessaires à chaque étape de la voie de biosynthèse sont mentionnés sur la droite du schéma. ASA : anthranilate synthase sous-unité α ; ASB : anthranilate synthase sous-unité β ; CdRP : 1-(Ocarboxyphenylamino)-1deoxyribulose-5-phosphate; IGP : indole-3-glycérol phosphate; IGS : indole-3-glycérol phosphate synthase; PAI : phosphoribosyl-anthranilate isomérase; PAT : phosphoribosylanthranilate transferase; PRA : 5-phosphoribosylanthranilate; TSA : tryptophane synthase sous-unité α et TSB : tryptophane synthase sous-unité β (d'après Ouyang et al, 2000).

2- La voie de biosynthèse d'auxine indépendante du tryptophane

La biosynthèse d'auxine dépendante du Trp que nous venons de voir, est la voie la plus connue et la mieux décrite. Cependant depuis le début des années 90, l'analyse de mutants affectés dans la synthèse de tryptophane, tels que le mutant *orange pericarp* chez le maïs, démontre que les plantes sont capables de synthétiser de l'IAA sans utiliser le tryptophane comme intermédiaire (Normanly et al., 1993; Wright et al., 1991). De plus les mutants *tryptophan2* (*trp2*) et *trp3* possèdent un niveau de Trp très faible alors que le niveau d'IAA n'est pas réduit (Ouyang et al., 2000). Ces données confirment la présence d'une voie de biosynthèse d'IAA indépendante du Trp. Les gènes responsables de ces mutations sont respectivement *TRYPTOPHAN SYNTHASE A1* (*TSA1*) et *TSB1*. Le premier induit la formation d'indole à partir d'indole 3-glycérolphosphate (IGP) et le second convertit l'indole en Trp (Figure 4) (Radwanski and Last, 1995). Ouyang et ses collaborateurs ont également produit des plantes transgéniques contenant un ARN anti sens de l'indole 3-glycerolphosphate synthase (IGS) qui convertit le 1-(Ocarboxyphenylamino)-1deoxyribulose-5-phosphate (CdRP) en IGP (Figure 4), et ont constaté que ces plantes possèdent un niveau très faible de Trp mais également d'IAA, ce qui indique que la voie de biosynthèse d'IAA indépendante du Trp utiliserait l'IGP pour synthétiser l'IAA. Cependant des expériences *in vitro* montrent que des extraits cellulaires de plantules mutantes *orange pericarp*, dépourvues de Trp, contiennent les enzymes nécessaires à la production d'IAA à partir d'indole radio-marqué (Ostin et al., 1999). Ceci suggère que l'indole serait également un intermédiaire dans la voie de production d'IAA indépendante du Trp. Cette voie de biosynthèse reste néanmoins mal connue.

B- Auxine libre et auxine conjuguée

Plusieurs études ont montré que l'IAA peut-être conjuguée par des liaisons ester à des sucres, par exemple le glucose, ou par des liaisons amide à des acides aminés ou des peptides (Kowalczyk and Sandberg, 2001; Ludwig-Muller et al., 2005a; Walz et al., 2008). Ainsi Walz et ses collaborateurs ont identifié sur la graine de haricot, différents polypeptides associés à l'IAA, dont le plus abondant, IAP1, s'accumule uniquement dans la graine et subit une dégradation rapide au cours de la germination (Walz et al., 2008). Kowalczyk et Sandberg ont identifié chez *Arabidopsis* plusieurs conjugués IAA-amino acide (Kowalczyk and Sandberg, 2001). L'apport d'IAA-Ala, d'IAA-Gly, d'IAA-Phe ou d'IAA-Leu produit un phénotype identique à celui produit par l'apport d'IAA contrairement à l'apport d'IAA-Asp, d'IAA-Ile

ou d'IAA-Val (Bartel and Fink, 1995). Ceci suggère que la plante est capable de produire de l'IAA libre en hydrolysant les conjugués IAA-Ala, IAA-Gly, IAA-Phe et IAA-Leu, mais pas les conjugués IAA-Asp, IAA-Ile et IAA-Val. En présence d'une quantité importante d'auxine, les conjugués oxydée OxIAA-Asp et OxIAA-Glc ont été identifiés (Kai et al., 2007; Ostin et al., 1998). Les conjugués IAA-Asp et IAA-Glc subirait une oxydation et pourrait être par la suite catabolisés. Contrairement aux autres conjugués, le conjugué IAA-Trp inhibe la réponse à l'auxine. En effet, la réponse à l'auxine mesurée à l'aide du gène rapporteur *DR5-GUS* est, en présence d'IAA, réduite chez les plantules ayant un apport d'IAA-Trp (Staswick, 2009). Ainsi, les plantules ayant un apport d'IAA-Trp sont moins sensibles à l'ajout d'IAA dans le milieu de culture que les plantules sans apport d'IAA-Trp.

La surexpression, chez *Arabidopsis*, du gène *UGT84B1*, appartenant à la famille des UGT, ou de son homologue chez le maïs, *IAGLU*, engendre une augmentation de la quantité d'IAA-glucose mais non d'IAA libre (Jackson et al., 2002; Ludwig-Muller et al., 2005b). Ces plantes sont également moins sensibles à l'apport exogène d'IAA que les plantes sauvages, mais non à l'apport exogène de 2,4D (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique), une auxine de synthèse (Jackson et al., 2002; Ludwig-Muller et al., 2005b). Ainsi, ces gènes seraient impliqués dans la synthèse d'auxine conjuguée. Staswick et ses collaborateurs ont montré *in vitro*, que six gènes appartenant à la famille *GH3*, codent des enzymes qui synthétisent plusieurs conjugués IAA-acide aminé (Staswick et al., 2005; Staswick et al., 2002). Des mutations dans ces gènes engendrent une augmentation de la sensibilité à l'IAA au niveau des racines, nous pouvons supposer que le taux de conjugaison de l'IAA étant plus faible, la quantité d'IAA libre est plus élevée ce qui engendrerait une sensibilité accrue à l'apport d'IAA (Staswick et al., 2005). D'ailleurs la surexpression de *GH3.6* conduit à une diminution de la sensibilité à l'apport d'IAA et à une augmentation du niveau d'IAA-Asp (Staswick et al., 2005). Ceci suggère que plusieurs gènes *GH3* codent des IAA-amido synthétases.

Une fraction de l'IAA conjuguée est hydrolysée pour produire de l'IAA libre. Certains conjugués sont stockés sous une forme inactive pour être ensuite hydrolysés via des hydrolases d'IAA-aminoacide. Chez *Arabidopsis*, six protéines présentant des régions très conservées ILR1(IAA-LEU RESISTANT 1), IAR3 (IAA-ALA RESISTANT 3), ILL1 (ILLR-LIKE 1), ILL2, ILL3 et ILL5 seraient des hydrolases d'IAA-aminoacide (Bartel and Fink, 1995; Davies et al., 1999). Ainsi la protéine ILR1 est capable de cliver *in vitro* plusieurs conjugués IAA-aminoacide (Bartel and Fink, 1995). Les mutants *ilr1* et *iar3* sont respectivement insensibles à l'apport exogène d'IAA-Leu et d'IAA-Ala alors que la plante surexprimant le

gène *ILR1* est plus sensible à l'apport d'IAA-Phe et d'IAA-Leu et que la plante sur exprimant le gène *IAR3* est plus sensible à l'apport d'IAA-Ala (Davies et al., 1999). Ces données suggèrent une certaine spécificité entre l'enzyme (ILR, IAR et ILL) et le type d'IAA-aminoacide qu'elle hydrolyse.

Toutes ces données montrent que l'IAA peut être stockée sous une forme conjuguée inactive mais les différentes formes de conjugués ainsi que leur mode de régulation restent à éclaircir.

C- Le transport de l'auxine

La molécule d'auxine ($pK_a=4,85$) peut en fonction du pH, être sous une forme dissociée, c'est-à-dire anionique IAA^- (perte d'un H^+) ou sous une forme non dissociée lipophile. Dans un environnement extracellulaire où le pH est de 5,5, la forme non dissociée est majoritaire et peut pénétrer dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane plasmique. Comme le pH du cytoplasme est moins acide ($pH=7$) que le pH extracellulaire, la forme anionique est donc plus importante dans le cytoplasme. La forme anionique ne pouvant pas diffuser à travers la membrane plasmique, elle est séquestrée dans le cytoplasme (Raven, 1975; Rubery and Sheldrak.Ar, 1974). On peut supposer que la sortie de la forme anionique nécessite donc probablement des transporteurs d'efflux d'auxine. L'étude de mutants a également permis de mettre en évidence un transport d'influx d'auxine.

1- L'influx d'auxine

L'analyse du mutant agravitropique *auxin resistant 1* (*aux1*) chez *Arabidopsis* a permis d'identifier une famille de protéines transmembranaires LIKE AUX1 (LAX) impliquées dans le transport actif d'efflux d'auxine (Bennett et al., 1996; Swarup et al., 2008). Le gène *AUX1* responsable de cette mutation, code une protéine dont la séquence est très proche des aminoacides perméases, ce qui suggère que la protéine est impliquée dans le transport de molécules aminoacides telles que l'auxine (Bennett et al., 1996). Le mutant *aux1* est résistant à l'apport exogène d'une auxine synthétique le 2,4D, et son phénotype est similaire à celui de plantules traitées avec du 1-naphthoxyacetic acid (1-NOA) ou du 3-chloro-4-hydroxyphenylacetic acid (CHPAA), deux inhibiteurs du transport d'influx d'auxine (Parry et al., 2001; Swarup et al., 2008). L'accumulation d'IAA à l'apex racinaire n'est plus détectable chez un mutant *aux1* et la distribution d'IAA dans les jeunes feuilles est altérée

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 5 : Importance du transport polarisé de l'auxine.

(A) Apex d'une plante mutante *pin-1* et (B) d'une plante sauvage traitée au NPA, un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine (d'après Okada et al, 1991).

(Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2001). De plus, Marchant et ses collaborateurs ont montré qu'AUX1 facilite le transport basipète de l'auxine (Marchant et al., 2002). Les mutants *lax3* et *aux1* présentent une diminution du nombre de racines latérales (Swarup et al., 2008). De plus, des cellules d'ovocytes de xénope cultivées sur un milieu contenant de l'IAA, présentent lorsqu'elles expriment *LAX3*, un niveau d'IAA intracellulaire plus important que lorsqu'elles n'expriment pas *LAX3* (Swarup et al., 2008). Des résultats similaires ont été obtenus avec *AUX1* (Swarup et al., 2008; Yang et al., 2006) ce qui suggère qu'AUX1 et LAX3 facilitent l'influx d'auxine. Le quadruple mutant *aux1 lax1 lax2 lax3*, contrairement aux simples mutants, présente un défaut de phyllotaxie suggérant que les gènes *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* et *LAX3* agiraient de façon redondante dans la mise en place de la phyllotaxie (Bainbridge et al., 2008). Les gènes *AUX1*, *LAX1* et *LAX2* altèrent la formation des maxima d'auxine. En effet, le patron d'expression de DR5, un marqueur de la réponse à l'auxine, présente au niveau du méristème apical caulinaire d'une plante sauvage des pics d'intensité à l'emplacement des futurs primordia d'organes alors que chez un triple mutant *aux1 lax1 lax2*, le marquage DR5 est homogène sur la périphérie du méristème et le mutant ne produit pas d'organe latéraux (Bainbridge et al., 2008).

2- L'efflux d'auxine

Au cours de ces vingt dernières années, deux familles de gènes impliquées dans l'export d'auxine ont été identifiées : la famille des protéines PIN-FORMED (PIN) spécifique des plantes, et la sous-famille des PHOSPHOGLYCOPROTEIN MULTIDRUG RESISTANCE (PGP/MDR) appartenant à la famille des ATP-BINDING CASSETTE de type B (ABCB) (Mravec et al., 2009; Verrier et al., 2008).

L'analyse de plusieurs mutants chez *Arabidopsis* présentant des défauts racinaires tels que *agravitropic 1 (agr1)*, *wavy roots 6 (wav6)* et *ethylene insensitive root 1 (eir1)*, et des défauts au niveau des organes aériens tel que *pin-formed 1 (pin1)* a conduit à l'identification de la famille de protéines PIN, impliquées dans l'efflux d'auxine (Okada and Shimura, 1990). Le phénotype du mutant *pin1* présente une absence d'organes latéraux, phénocopiant des plantes traitées avec un inhibiteur du transport polarisé d'auxine : l'acide N-1-naphthyl-phthalamic (NPA) (Figure 5) (Okada et al., 1991). La quantité d'auxine et le transport polarisé d'auxine sont réduits chez le mutant *pin1* et la protéine transmembranaire PIN1 présente une localisation polaire au niveau cellulaire (Galweiler et al., 1998; Okada et al., 1991). Différentes études montrent que le gène *PIN2* est responsable des mutations *agr1*, *wav6* et *eir1* (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Muller et al., 1998; Utsuno et al.,

1998). La séquence protéique de PIN2 est très similaire à la séquence des transporteurs membranaires bactériens. De plus, la protéine présente elle aussi une localisation cellulaire polarisée (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Muller et al., 1998; Utsuno et al., 1998). Les plantules mutantes pour *PIN2* sont résistantes à l'application d'inhibiteur du transport polarisé d'auxine (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Utsuno et al., 1998). Chen et ses collaborateurs ont également montré que lorsque *AGR1/PIN2* est exprimé chez *Saccharomyces cerevisiae*, on constate une augmentation d'efflux d'auxine radio-marquée (Chen et al., 1998). Chez *A. thaliana*, la famille *PIN* compte huit membres subdivisés en deux groupes différant par la longueur de la boucle hydrophile conservée chez toutes ces protéines. Le sous-groupe composé de PIN5, PIN6 et PIN8 possède une boucle hydrophile réduite. Ces protéines, localisées dans le réticulum endoplasmique, sont probablement impliquées dans le transport d'auxine entre le réticulum endoplasmique et le cytosol (Mravec et al., 2009). Les protéines PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 et PIN7 sont par contre localisées à la membrane plasmique et agiraient en expulsant l'auxine de la cellule (Mravec et al., 2009; Petrasek et al., 2006).

Parmi les membres de la famille ABCB, les protéines PGP1, PGP4 et PGP19 ont été identifiées comme impliquées dans l'efflux d'auxine (Geisler et al., 2005; Noh et al., 2001; Santelia et al., 2005). Les mutants associés à une perte de fonction de ces protéines présentent un phénotype semblable à celui d'une plante traitée avec du NPA, inhibiteur du transport polarisé d'auxine : une augmentation de la formation de racines latérales, des cotylédons épínastiques et une réduction de la dominance apicale (Noh et al., 2001; Terasaka et al., 2005). Les mutants sont également résistants à l'application exogène de NPA et hypersensibles à l'apport exogène d'auxine (Geisler et al., 2005; Santelia et al., 2005). Chez ces mutants on peut supposer que l'auxine est en partie séquestré à l'intérieure de la cellule puisque l'efflux d'IAA ce qui explique La résistance au NPA et l'hypersensibilité à l'IAA pourrait s'expliquer chez des mutants présentant un défaut d'efflux d'auxine, le NPA ayant la même action il ne perturberait pas le phénotype alors que l'apport d'IAA engendrerait une accumulation d'IAA dans les cellules ne pouvant pas ou peu sortir de la cellule, une faible quantité d'IAA pourrait engendrer un phénotype drastique. Leur rôle dans l'efflux de l'auxine a été mis en évidence sur des cellules de tabac, des cellules humaines HeLa et des cellules de levures (Geisler et al., 2005; Petrasek et al., 2006; Santelia et al., 2005).

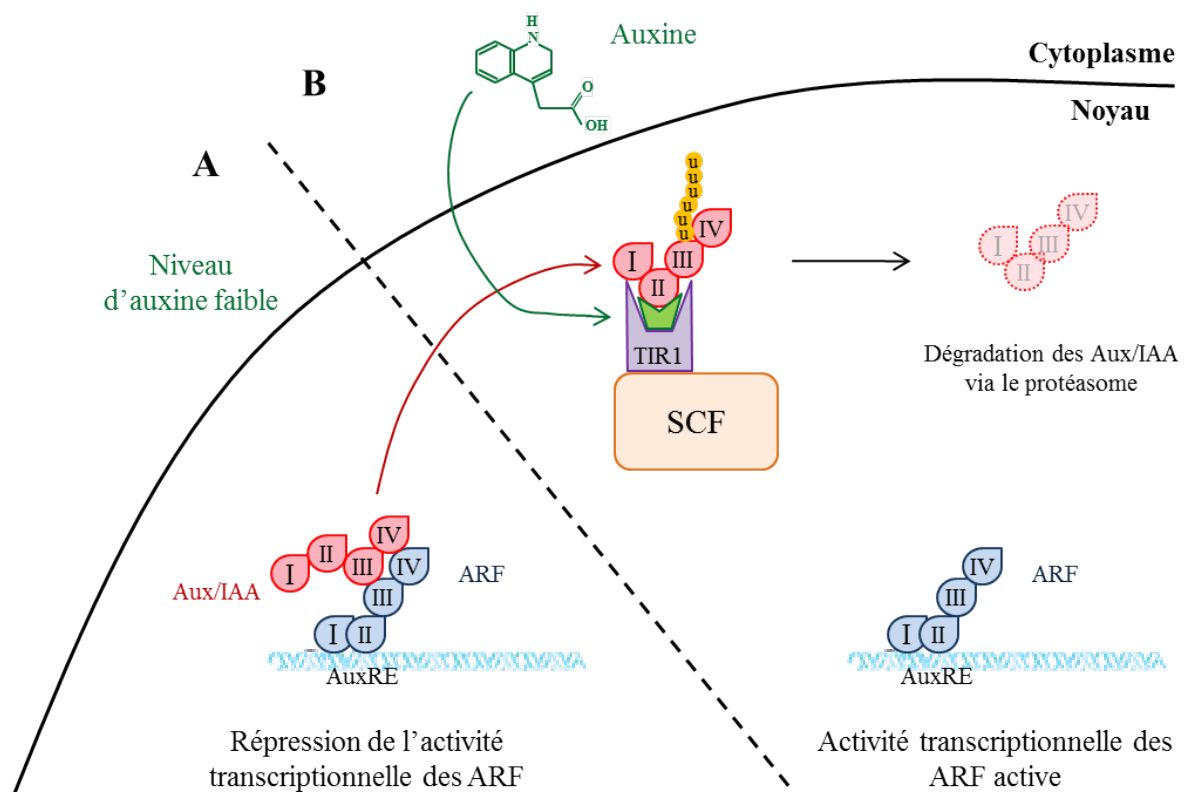


Figure 6 : Schéma de la signalisation de l'auxine.

Les facteurs de transcription ARF se fixent sur le promoteur des gènes de réponse à l'auxine au niveau d'un motif appelé AuxRE. (A) En présence d'un faible niveau d'auxine, les Aux/IAA et les ARF se dimérisent ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle des ARF. (B) En présence d'un niveau d'auxine plus élevé, le complexe SCF^{TIR1}-Aux/IAA se forme ce qui engendre une ubiquitination des Aux/IAA qui seront ensuite dégradés via le protéasome. Les ARF peuvent alors activer ou inhiber les gènes de réponse à l'auxine. AuxRE : Auxin Response Element; ARF : AUXIN RESPONSE FACTOR; SCF : SKP1 - Cullin - F-box; TIR1 : TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1; u : ubiquitine.

D- La signalisation de l'auxine

1- Les Aux/IAA et les ARF sont les acteurs de la signalisation de l'auxine

L'application d'auxine engendre la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus développementaux (Goda et al., 2004; Nemhauser et al., 2006; Overvoorde et al., 2005). L'analyse des régions promotrices de gènes induits par l'auxine (*PS-IAA4/5* chez le pois et *GH3* chez le soja), a permis de révéler la présence d'une séquence consensus TGTCTC appelée AuxRE (Auxin Response Element) (Ballas et al., 1993; Liu et al., 1994) impliquée dans la réponse transcriptionnelle (Figure 6). Il a été montré que des répétitions de cette séquence couplée à un promoteur minimal était nécessaire et suffisante pour activer la transcription d'un gène rapporteur de façon auxine dépendante (Ballas et al., 1995; Friml et al., 2003; Heisler et al., 2005; Ulmasov et al., 1995). Cette construction, appelée DR5, est depuis utilisée comme marqueur de réponse à l'auxine. Une expérience de simple hybride avec la séquence AuxRE comme proie, a permis l'identification d'un facteur de transcription capable de se fixer sur cette séquence. Il a été nommé AUXIN RESPONSE FACTOR 1 (ARF1) (Ulmasov et al., 1997a). En parallèle, l'analyse de gènes rapidement induits par l'auxine, notamment *PS-IAA4/5* et *PS-IAA6* chez le pois et *IAA1* et *IAA2* (induit par l'auxine en moins de 8 minutes) chez *Arabidopsis*, a permis l'identification d'une famille de gènes nommés Aux/IAA (AUXINE/INDOLE-3-ACETIC ACID) (Abel et al., 1994). L'interaction entre les ARF et les Aux/IAA a été démontrée sur la levure par des tests de double hybride (Ulmasov et al., 1997b). Chez *Arabidopsis*, on compte 23 gènes appartenant à la famille des ARF et 29 gènes appartenant à la famille des Aux/IAA.

Le domaine de liaison à l'ADN des ARF en position amino-terminale a été mis en évidence *in vitro* par gel retard avec des protéines ARF1 tronquées (Ulmasov et al., 1997a). Au centre des protéines ARF, on trouve une région conservée qui peut être riche soit en proline soit en glutamine. Cinq ARF (ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 et ARF19) possèdent une région centrale (MR pour "Middle Region") riche en glutamine, alors que les autres ARF possèdent une MR riche en proline. Des analyses de l'activité transcriptionnelle des ARF 1 à 9 réalisées sur des protoplastes, ont permis de mettre en évidence une activité transcriptionnelle répressive pour les ARF1 à 4 et l'ARF9, possédant une région centrale riche en proline, et une activité transcriptionnelle activatrice pour les ARF5 à 8, possédant un domaine riche en glutamine (Tiwari et al., 2003; Ulmasov et al., 1999a). De plus, des tests

effectués chez la levure sur l'activité transcriptionnelle de ces deux types de région MR fusionnées à un gène rapporteur, montrent une activité transcriptionnelle activatrice pour la région riche en glutamine et une activité transcriptionnelle inhibitrice pour la région riche en proline (Tiwari et al., 2003). Ces données suggèrent que les ARF possédant un domaine MR riche en glutamine sont des ARF activateurs alors que les ARF possédant un domaine MR riche en proline sont des ARF inhibiteurs. En position carboxy-terminale, à l'exception d'ARF3, 13, 17 et 23, les ARF possèdent deux domaines conservés nommés domaines III et IV. Ces domaines sont similaires aux domaines III et IV présents chez les Aux/IAA et sont nécessaires à l'interaction entre les ARF et les Aux/IAA (Ouellet et al., 2001; Tiwari et al., 2003; Ulmasov et al., 1997b). Ces domaines sont également nécessaires aux Aux/IAA pour se dimériser au sein de leur propre famille (Kim et al., 1997; Ouellet et al., 2001). Des analyses supplémentaires sur des cellules de protoplastes montrent que l'activation d'un gène rapporteur par ARF5 est inhibée en présence d'IAA17 et que cette inhibition est abolie lorsqu'ARF5 est dépourvu de sa région carboxy-terminale contenant les domaines III et IV (Tiwari et al., 2003). Ceci suggère que les IAA inhibent l'activité transcriptionnelle des ARF par dimérisation via les domaines III et IV des ARF. Cependant l'activité transcriptionnelle d'ARF5 en présence d'IAA17 est partiellement restaurée lorsque l'on ajoute de l'auxine. D'autres résultats similaires montrent que l'activité des Aux/IAA est inhibée par la présence d'auxine et que *in planta*, les protéines sont dégradées en présence d'auxine (Maraschin Fdos et al., 2009; Tiwari et al., 2003; Tiwari et al., 2001). Ces données suggèrent que l'auxine dégrade les Aux/IAA. Les plantes mutantes *axr3*, *axr2* et *shy2* possèdent une mutation au niveau du domaine II respectivement des gènes *IAA17*, *IAA7* et *IAA3* (Nagpal et al., 2000; Rouse et al., 1998; Tian and Reed, 1999). Ces trois mutants montrent une réduction de la sensibilité à l'auxine. De plus, *in planta*, la protéine IAA17mII (protéine IAA17 mutée au niveau du domaine II) n'est pas dégradée en présence d'auxine (Gray et al., 2001; Nagpal et al., 2000; Rouse et al., 1998; Tian and Reed, 1999). De même, Tiwari et ses collaborateurs montrent sur des cellules de protoplastes, que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'ARF5 par IAA17 est maintenue en présence d'auxine lorsque le domaine II d'IAA17 est muté (Tiwari et al., 2003). L'ensemble de ces données suggèrent que c'est via le domaine II que les Aux/IAA sont dégradés en présence d'auxine. Une mutation dans le domaine I des Aux/IAA engendre une diminution de l'action répressive des Aux/IAA sur un gène rapporteur de la réponse à l'auxine en absence d'auxine (Tiwari et al., 2004; Tiwari et al., 2001). De plus ce domaine est nécessaire et suffisant pour réprimer l'effet activateur induit par l'ajout de

VP16, un domaine activateur de la transcription provenant du virus de l'herpès (Tiwari et al., 2004). Le domaine I des Aux/IAA serait donc un domaine répresseur de la transcription.

2- La voie du protéasome est nécessaire à la réponse à l'auxine

La réponse à l'auxine est dépendante de la voie de dégradation par le protéasome (Figure 6). En effet, des études montrent que la dégradation d'Aux/IAA est abolie lorsque les plantules sont traitées avec un inhibiteur du protéasome, le MG115 ou le MG132 (Gray et al., 1999; Ramos et al., 2001). Les Aux/IAA sont préalablement ubiquitinylés par le complexe SCF^{TIR1} (SKP1 - Cullin - F-box^{TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1}) avant d'être dégradés via le protéasome. Ce complexe se compose de quatre sous-unités : SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1 (SKP1) ou ARABIDOPSIS SKP1-LIKE (ASK) chez les plantes, CULLIN (CUL), RING BOX1 (RBX1) et une protéine avec un motif de type "F-box" (FBP) qui réceptionne le substrat (Bai et al., 1996; Feldman et al., 1997; Kamura et al., 1999; Ohta et al., 1999; Seol et al., 1999; Tan et al., 1999). Chez Arabidopsis, lorsque les gènes codant ces protéines sont mutés, on constate une accumulation d'Aux/IAA et une diminution de la réponse à l'auxine (Dharmasiri et al., 2005b; Gray et al., 1999; Gray et al., 2001; Hellmann et al., 2003). Par exemple, le mutant *axr6*, dont le gène code la sous-unité CUL1, est résistant à l'apport exogène d'auxine et présente une accumulation d'IAA7 (Hellmann et al., 2003). Chez Arabidopsis, le gène *TIR1* code une protéine avec un motif de type "F-box" qui interagit avec les protéines ASK1, ASK2 et AtCUL1, ce qui suggère que TIR1 est une sous-unité du complexe SCF^{TIR1} (Gray et al., 1999). TIR1 a également été identifiée comme un régulateur positif de la réponse à l'auxine. Ainsi, lorsque le gène *TIR1* est surexprimé, la réponse à l'auxine augmente alors que lorsqu'il est muté, on observe une accumulation d'IAA17 (Dharmasiri et al., 2005a; Gray et al., 2001; Ruegger et al., 1998). Des expériences ont montré que le complexe SCF^{TIR1} interagit avec des Aux/IAA et que leur domaine protéique DII est nécessaire et suffisant à cette interaction (Gray et al., 2001; Zenser et al., 2001). De plus, l'interaction SCF^{TIR1}-Aux/IAA est stimulée par la présence d'auxine (Dharmasiri et al., 2005a; Gray et al., 2001). Il a également été montré, à l'aide d'auxine radioactive, que l'auxine se lie spécifiquement au complexe SCF^{TIR1}, ce qui signifie qu'un récepteur à l'auxine fait probablement partie de ce complexe (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). Des expériences de co-immunoprécipitation *in vitro* montrent que la protéine TIR1 ainsi que trois autres protéines F-box, appelées AUXIN SIGNALING F-BOX 1 (AFB1), AFB2 et AFB3 interagissent avec IAA7 de manière auxine dépendante (Dharmasiri et al., 2005a; Dharmasiri et al., 2005b). Une autre expérience de co-

immunoprécipitation montre l'importance du domaine F-box dans l'interaction TIR1-Aux/IAA (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). La spécificité de l'interaction TIR1-Aux/IAA en présence d'auxine a également été testée après synthèse puis extraction de ces protéines dans deux systèmes hétérologues : des embryons de xénope et des cellules d'insecte (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). Ces études montrent que le complexe SCF^{TIR1}-Aux/IAA se forme en présence d'auxine et qu'il se lie spécifiquement à l'auxine. De plus, dans un système hétérologue et en présence d'auxine, on constate la formation du complexe TIR1-Aux/IAA. L'ensemble de ces données suggère que le récepteur à l'auxine peut être soit la protéine TIR1 soit un Aux/IAA. Le fait que la liaison à l'auxine, sur des extraits de plante, soit abolie en absence des protéines TIR1 et AFB1, 2 et 3, ainsi que les résultats d'analyses cristallographiques du complexe TIR1-IAA permettent de supposer que les protéines F-box (TIR1, AFB1, 2 et 3) sont les récepteurs à l'auxine (Dharmasiri et al., 2005a; Tan et al., 2007).

E- Auxine et paroi

L'auxine est impliquée dans de nombreux processus développementaux au cours de la croissance de la plante. En effet, la présence d'auxine engendre chez le maïs, le pois et l'avoine par exemple une augmentation de la longueur du coléoptile ou chez Arabidopsis une augmentation de la longueur des poils racinaires (Kapulnik et al., 2011; Schopfer et al., 2002). L'auxine promeut également chez Arabidopsis la différenciation de la coiffe racinaire et l'organogénèse, ainsi le mutant *pin*, dont le transport de l'auxine est altéré, ne produit pas d'organes latéraux (Okada et al., 1991; Wang et al., 2005). Cependant, les mécanismes par lesquels l'auxine contrôle la croissance et l'organogénèse restent à élucider.

La croissance cellulaire est une déformation irréversible de la cellule. La cellule est soumise à une pression interne, appelé pression de turgescence, qui lui permet de gonfler. Dans les cellules végétales, la pression de turgescence a été estimée et pourrait atteindre des valeurs supérieures à 10 bar, c'est-à-dire à 10Kg/cm². Soumise à cette pression très élevée, la cellule pourrait éclater sans la présence d'une paroi rigide. Dans les cellules végétales en croissance, le remodelage et la synthèse de la paroi cellulaire permettrait à la cellule, sous l'effet de la pression de turgescence, de croître (Hamant et al., 2010). La pression de turgescence serait le moteur de la croissance contrôlée par la résistance de la paroi. Une étude récente montre par AFM (microscopie à force atomique) que la zone périphérique du méristème d'Arabidopsis d'où émergent les primordia est moins rigide que le centre du

méristème (Milani et al., 2011). Ce qui suggère qu'un assouplissement de la paroi est nécessaire à la morphogenèse. On observe que lorsque la déméthylation des pectines est inhibée l'organogenèse est abolie (Peaucelle et al., 2008). De façon intéressante, on observe le même phénomène lorsque le transport de l'auxine est bloqué (Okada et al., 1991). On remarque également à la périphérie du méristème apical que la position des primordia co-localise avec le signal DR5, marqueur de la réponse à l'auxine, mais également avec la présence de pectines déméthylestérifiées (de Reuille et al., 2006; Peaucelle et al., 2008). De plus, des études ont montré que l'auxine peut engendrer des modifications de la paroi cellulaire. Ainsi, l'auxine induit la transcription de gènes impliqués dans le remodelage de la paroi cellulaire, comme des xyloglucan endotransglycosylases (XTH), des expansines, des pectinméthylestérases (PME) et des arabinogalactane protéines (AGP) qui sont réprimées chez le mutant *axr3-1*, mutant répresseur de la réponse à l'auxine (Overvoorde et al., 2005). De plus, Esmon et ses collaborateurs ont montré qu'au cours du phénomène de gravitropisme, l'expression du gène de l'expansine *EXPA8*, codant une enzyme impliquée dans l'extension de la paroi, est nécessaire à la courbure de l'hypocotyle et est activée par l'auxine via ARF7 (Esmon et al., 2006). Des études montrent également que l'inhibition de l'élongation racinaire par l'isoxaben, un inhibiteur de la synthèse de cellulose, est abolie en présence de PEO-IAA (α -phenylethyl-2-oxo-indole acetic acid) un inhibiteur de la réponse à l'auxine (Tsang et al., 2011).

En conclusion, l'auxine et le remodelage de la paroi sont impliqués dans des processus développementaux communs. Il y a également des évidences pour que l'auxine agisse, au moins en partie, via le remodelage de la paroi.

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 7 : Structure schématique de la paroi cellulaire primaire.

Les microfibrilles de cellulose (tiges violettes) sont synthétisées par des complexes hexamériques de cellulose synthases situés dans la membrane plasmique, tandis que l'hemicellulose et les pectines, qui composent la matrice de polysaccharides, sont synthétisés dans l'appareil Golgi et sont déposés à la surface de la paroi par des vésicules. L'hemicellulose, liée aux microfibrilles de cellulose est composée majoritairement de xyloglucanes (bleu) mais également d'arabinoxylanes (gris) et de mannanes (non représentés) en moindre quantité. La pectine, élément majoritaire de la paroi cellulaire primaire, se compose de trois domaines, l'homogalacturonane (rouge), le rhamnogalacturonane I (orange) et le rhamnogalacturonane II (ellipse rouge), associés à plusieurs autres composés tels que le xylogalacturonane (rouge/vert) et l'arabinane (vert) (d'après Cosgrove, 2005).

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 8 : Structure schématique de la pectine.

La pectine est composée de trois domaines principaux : homogalacturonane (HG), rhamnogalacturonane I (RG-I) et rhamnogalacturonane II (RG-II). L'acide galacturonique de l'HG peut être substitué au niveau du carbone 3 (C3) par un résidu xylose produisant un domaine appelé xylogalacturonane (XGA). (d'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1924/>).

III-La paroi cellulaire

La paroi cellulaire primaire est principalement composée de microfibrilles de cellulose incorporées dans un gel de polysaccharides dont les deux composants majoritaires sont l'hémicellulose et la pectine (Carpita and Gibeaut, 1993; Zablackis et al., 1995). Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par des complexes hexamériques situés dans la membrane plasmique, tandis que l'hémicellulose et la pectine, qui composent la matrice de polysaccharides, sont synthétisées dans l'appareil de Golgi et sont déposées à la surface de la paroi par des vésicules (Figure 7) (Cosgrove, 2005). L'hémicellulose, liée aux microfibrilles de cellulose, est composée majoritairement de xyloglucanes mais également d'arabinoxylanes et de mannanes en moindre quantité. La pectine, composant majoritaire de la paroi primaire, est détaillé ci-dessous.

A- La pectine

La pectine est composée de polysaccharides riches en acide galacturonique (GalUA). Elle est constituée de trois domaines polysaccharidiques : l'homogalacturonane (HG) et le rhamnogalacturonane (RG) I et II. Le domaine HG est formé uniquement du squelette de GalUA, pouvant être associé à des positions variables à un autre sucre, comme par exemple le xylose formant ainsi un xylogalacturonane (XGA) ou l'apiofuranose formant ainsi l'apiogalacturonane (AP). La composition du domaine RGII est plus complexe puisque douze types de résidus glycosyls sont associés au squelette de GalUA (figure 8). Le domaine RGI est le seul domaine dont le squelette n'est pas composé exclusivement de GalUA, mais d'une succession de GalUA et de Rhamnose. Le Rhamnose peut être associé à des chaînes d'arabinane (chaîne de résidu arabinose) ou d'arabinogalactane (chaîne de résidu arabinose et galactose). Le squelette d'acide galacturonique peut être modifié : par exemple le carboxyle C6 peut être méthyl estérifié et les oxygènes en position 2 et 3 peuvent être acétylés (Ishii, 1997).

La biosynthèse des pectines auraient lieu principalement dans l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi est un organite qui joue un rôle majeur dans le processus d'exocytose. Il sert d'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Il est formé d'un empilement de vésicules aplaties et orientées et présente une face cis (face d'entrée du

matériel provenant du réticulum endoplasmique), une région médiane et une face trans (face d'où bourgeonne les vésicules) (Zhang and Staehelin, 1992). Plusieurs enzymes de biosynthèse de la pectine co-localisent avec des marqueurs de l'appareil de Golgi. Par exemple, la glycosyltransférase impliquée dans la synthèse de l'HG ou l'arabinsyltransférase impliquée dans la synthèse de l'arabinane, composant du RGI, sont présentes dans l'appareil de Golgi (Geshi et al., 2004; Goubet and Mohnen, 1999; Nunan and Scheller, 2003; Powell and Brew, 1974; Sterling et al., 2001). De plus, l'immunolocalisation de plusieurs composants de la pectine ont été identifiés dans différents compartiments de l'appareil de Golgi. Ainsi, l'anticorps monoclonal JIM7 qui reconnaît un groupement méthyl ester associé à un acide galacturonique, est observé principalement dans la région médiane et trans de l'appareil de Golgi, et l'anticorps polyclonal anti-XG, spécifique de la chaîne principale du xyloglycane (XG), se situe principalement dans la région trans et dans les vésicules de l'appareil de Golgi (Knox et al., 1990; Lynch and Staehelin, 1992; Moore et al., 1991; Zhang and Staehelin, 1992). Ces polysaccharides sont ensuite sécrétés dans la paroi et forment un gel de pectine. L'homogalacturonane, composant majoritaire de la pectine, est sécrété dans la paroi cellulaire avec un taux élevé de méthyl estérification. Ce taux résulte de l'activité méthyltransférase dans l'appareil de Golgi (Miao et al., 2011; Mouille et al., 2007; Zhang and Staehelin, 1992). Une fois incorporé dans la paroi cellulaire, l'homogalacturonane peut être déméthylé par des pectines méthylestérases (PME) (Peaucelle et al., 2008; Ross et al., 2011). Ces résidus déméthylés sont alors capables de se lier à des ions calcium Ca^{+} , formant ainsi une structure appelée "boîte à œuf" qui augmenterait la rigidité du gel de pectine (Liners et al., 1989; McKenna et al., 2010; Peaucelle et al., 2008). La déméthylation des pectines et la formation des "boîte à œuf" seraient associées à une augmentation de la résistance mécanique de la paroi. Ainsi, lorsque le gène *PEST1* codant une PME est surexprimé chez la pomme de terre, on constate une augmentation du taux de pectines déméthylées associée à une texture plus ferme du tubercule de pomme de terre (Liners et al., 1989; Ross et al., 2011). Le taux de méthylation des pectines joue ainsi un rôle dans divers aspects du développement de la plante, tels que la résistance aux pathogènes, le mûrissement du fruit, l'adhésion cellulaire, la croissance du tube pollinique et plus largement, l'organogenèse (Barnavon et al., 2001; Bosch et al., 2005; Bouton et al., 2002; Mouille et al., 2007; Peaucelle et al., 2008; Volpi et al., 2011).

L'activité des PME semble avoir des effets opposés sur les propriétés mécaniques de la paroi. D'une part, en produisant un ensemble de groupement carboxyl déméthylestérifié

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 9 : Structure tridimensionnelle d'une PME de carotte.

La structure de la protéine a été déterminée par cristallographie. Elle montre une structure en hélice constitué de feuillets parallèles. Les feuillets PB1, PB2 et PB3 sont colorés respectivement en marron, vert et jaune. La boucle formant la zone de liaison à la pectine est en rouge et les régions ne participant pas à la formation des feuillets sont en blanc (d'après Johansson et al, 2002).

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 10 : Représentation schématique des domaines protéiques des PME chez Arabidopsis. (D'après Dedeurwaerder et al., 2009).

pouvant interagir avec des ions calcium, les PME favorisent la formation d'un gel de pectine et donc contribueraient à la rigidité de la paroi (Liners et al., 1989; McKenna et al., 2010), d'autre part, au cours de la déméthylestérification des pectines par les PME, des protons sont libérés dans la paroi ce qui stimule l'activité d'hydrolases favorisant le ramollissement de la paroi (Moustakas et al., 1991; Nari et al., 1986).

B- Les pectines méthylestérases (PME) et leurs inhibiteurs (PMEI)

Comme on peut le voir sur la Figure 9, la structure tridimensionnelle des PME est caractérisée par trois feuillets β parallèles (PB1 en marron, PB2 en vert et PB3 en jaune) connectés par des boucles. Les boucles indiquées en rouge sur la figure 9 forment le site de liaison putatif à la pectine (Johansson et al., 2002). L'analyse de la séquence génomique d'*Arabidopsis* révèle la présence de 66 PME putatives appartenant à la famille des glycosides hydrolases de classe 8 (CAZyme, <http://www.cazy.org/CE8.html>). Ces protéines sont exprimées différemment en fonction des tissus et des stades de développement de la plante (Louvet et al., 2006). Parmi ces 66 PME, 23 contiennent uniquement le domaine catalytique PME, elles appartiennent au type II, alors que 43 présentent en plus de ce domaine, un domaine PRO, et appartiennent au type I (Markovic and Jornvall, 1992; Ray et al., 1988; Tian et al., 2006). L'analyse de la séquence d'acides aminés des PME montre qu'un grand nombre de PME présentent en position N-terminale, un peptide signal (PS) ou un domaine transmembranaire (TM) (Figure 10) (Dedeurwaerder et al., 2009). La localisation subcellulaire de la PME3 d'*Arabidopsis* montre *in vivo* qu'en absence de peptide signal, la protéine est localisée uniquement dans le cytoplasme alors qu'en présence du peptide signal, la protéine est également localisée dans la paroi cellulaire (Hewezi et al., 2008; Tian et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus avec le domaine TM sur des cellules de tabac où le domaine TM fusionné à la GFP (protéine fluorescente verte) est nécessaire à la localisation de la protéine chimère à la paroi (Dorokhov et al., 2006). La séquence du domaine PRO des PME de type I présente des homologies avec le domaine des inhibiteurs de PME. De plus, il semble jouer un rôle inhibiteur sur l'activité des PME. Ainsi, Bosch et ses collaborateurs ont montré que l'apex d'un tube pollinique d'une plante sauvage présente des pectines majoritairement méthylestérifiées, alors que l'apex d'un tube pollinique d'une plante exprimant une PME de type I dépourvue du domaine PRO, présente des pectines majoritairement déméthylestérifiées (Bosch et al., 2005). Dorokhov et ses collaborateurs ont

NON-LIBRE DE DROIT

Figure 11 : Surface moléculaire du complexe PME-PMEI.

(A) Représentation de la surface moléculaire de la PME (violette) et de son inhibiteur (vert)

(B) Même représentation que sur la partie (A) montrant la surface moléculaire de la PME (violette) et la structure tridimensionnelle de la PMEI (vert), composée d'une région hélicoïdale en N-terminal et de quatre groupements d'hélice α , $\alpha 1$ à $\alpha 4$ (d'après Di Matteo et al., 2005).

remplacé le domaine PME d'une PME de type I par la séquence codante de la protéine fluorescente verte. Dans ces plantes produisant une protéine chimère PRO-GFP, ils montrent que seule la protéine GFP (sans le domaine PRO) est présente dans la fraction apoplasmique (Dorokhov et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les PME de type I sont clivées entre le domaine PRO et le domaine PME, avant d'être sécrétées dans la paroi. La région située entre les domaines PRO et PME contient deux motifs basiques très conservés, BM1 et BM2, nécessaires au clivage de la protéine (Wolf et al., 2009). La protéine PME mature serait donc constituée du domaine PME en position C-terminale. Ces motifs basiques ont également été montrés comme étant nécessaires à la sécrétion des PME puisque lorsqu'ils sont mutés, la protéine est séquestrée dans l'appareil de Golgi. En revanche, le domaine PME n'est pas nécessaire à la localisation apoplasmique de la protéine (Wolf et al., 2009).

Un inhibiteur protéique des PME appelé PME1 a, dans un premier temps été identifié chez le kiwi puis chez *Arabidopsis* où l'analyse génomique a permis d'identifier 69 gènes PME1 putatifs (Camardella et al., 2000; Raiola et al., 2004; Wolf et al., 2003). Les PME et les PME1 forment un complexe stœchiométrique 1:1 réversible qui inhiberait l'activité des PME *in vitro* et *in vivo* (D'Avino et al., 2003; Giovane et al., 2004; Peaucelle et al., 2008; Raiola et al., 2004). L'affinité entre les protéines PME et PME1 est élevée à un pH compris entre 5 et 6 proche du pH de la région apoplasmique (pH \approx 5,5) (Ciardiello et al., 2004). Des expériences de cristallographie du complexe PME-PME1 montrent que la protéine inhibitrice PME1 recouvre une zone de la protéine PME formant un sillon qui serait le site actif de l'enzyme (Figure 11) (Di Matteo et al., 2005; Johansson et al., 2002). La PME1 de kiwi est capable d'inhiber l'activité des PME, mais pas l'activité d'autres enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides telles que les polygalacturonases ou les amylases (Balestrieri et al., 1990). Elle semble donc spécifique des PME. Les PME1 sont composées de quatre groupements d'hélice α 1 à α 4 antiparallèles, dont l'agencement est très proche de celui des inhibiteurs d'invertase CIF (CELL WALL INHIBITOR OF β -FRUCTOSIDASE), et en position N-terminale, de trois courtes hélices (Figure 11) (Hothorn et al., 2004a; Hothorn et al., 2004b). Les PME1 possèdent cinq cystéines très conservées, dont quatre sont connectées deux à deux par des ponts disulfures et jouent un rôle important dans le maintien de la structure protéique (Camardella et al., 2000). L'analyse cristallographique de la PME1 d'*Arabidopsis* a montré la présence d'une région d'hélice α en tête d'épingle, qui correspondrait au site actif de l'enzyme (Hothorn et al., 2004b). En effet, l'activité inhibitrice des PME1 est inactivée lorsque cette région d'hélice α en tête d'épingle est tronquée, alors que

la protéine chimère composée de la région en tête d'épingle de la PMEI fusionnée aux quatre groupements d'hélice de la protéine CIF, est active contre les PME (Hothorn et al., 2004b). Hothorn et ses collaborateurs ont également montré que la protéine chimère composée de la région en tête d'épingle de la protéine CIF fusionnée aux quatre groupements d'hélice de la PMEI est inactive contre les PME (Hothorn et al., 2004b). Ces résultats suggèrent que le site actif de la PMEI se situe au niveau de zone en tête d'épingle. Giovane et ses collaborateurs ont montré chez le kiwi qu'une PMEI est présente dans le fruit immature sous une forme inactive, avec une masse moléculaire élevée, et qu'elle est transformée en protéine active avec une masse moléculaire plus faible au cours du murissement du fruit (Giovane et al., 1995). Ces données suggèrent que la protéine PMEI mature et active doit être clivée.

C- Exemples d'enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire

1- Les pectates lyases

Chez les plantes, les premiers gènes codant des pectates lyases (PL) *LAT56 (LATE ANTHETOMATO 56)* et *LAT59* ont été isolés sur du pollen de tomate (Wing et al., 1990). Depuis, 26 pectates lyases putatives ont été identifiées chez *Arabidopsis*. Les pectates lyases clivent la liaison α -1,4-glycosidique des pectines déméthylées en présence de Ca^{2+} (Davis et al., 1984; Domingo et al., 1998). L'analyse de la séquence nucléique montre que toutes les PL d'*Arabidopsis* présentent une région homologue à la pectate lyase C d'*Erwinia chrysanthemi* nommé *Pec_lyase_C* (Sun and van Nocker, 2010). Vingt-trois des PL d'*Arabidopsis* présentent potentiellement un peptide signal amino-terminal, quatre présentent une petite région conservée en amont du domaine *Pec_lyase_C* dont la fonction n'a pas été étudiée et une PL, la *PLL13/PMR6 (PECTATE LYASE-LIKE/POWDERY MILDEW RESISTANCE 6)*, possède un domaine carboxy-terminal prédit comme une région glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (Sun and van Nocker, 2010). Le domaine GPI serait le point d'ancrage de la protéine *PMR6* à la surface de la membrane plasmique (Ferguson and Williams, 1988; Sun and van Nocker, 2010). Le mutant *pmr6-1 (powdery mildew resistance 6)* présente une paroi cellulaire plus riche en pectine que la paroi cellulaire d'une plante sauvage (Vogel et al., 2002). De plus, des études ont montré que la diminution de l'expression de la *PECTATE LYASE 1 (PL1)* chez la fraise engendre une diminution de la solubilisation de la pectine et une augmentation de la fermeté du fruit (Jimenez-Bermudez et al., 2002; Santiago-Domenech et al., 2008). Chez la fraise, une étude visant à identifier des gènes spécifiquement exprimés dans le fruit mature

met en évidence une pectate lyase, NJJS25, fortement exprimée dans le fruit mature alors que son expression est faible dans le fruit immature et nulle dans les autres tissus de la plante (Medina-Escobar et al., 1997). Ces données sont cohérentes avec le rôle des pectates lyases dans la dégradation des pectines et le ramollissement du fruit. Le mutant *pmr6* plus petit qu'une plante sauvage possède une expansion cellulaire plus faible, suggérant que la PMR6 joue un rôle dans la croissance de la plante (Vogel et al., 2002). Le patron d'expression de l'ensemble des pectates lyases d'*Arabidopsis* a été identifié par Sun et van Nocker à l'aide de fusion entre les promoteurs des 26 PL et GUS, un gène rapporteur. Ces données montrent que chez *Arabidopsis* les PL sont principalement exprimées dans les zones de séparation cellulaire telles que les zones d'abscission des sépales, pétales, étamines et graines, les zones de déhiscence du fruit et les zones d'émergences des racines latérales par exemple (Sun and van Nocker, 2010). Ce qui suggère que les PL lyase seraient également impliqués dans le phénomène de séparation cellulaire. Le niveau d'expression des PL semblent régulé par des signaux variés. Ainsi, l'expression d'une PL, *BAN17*, chez la banane est induite par l'éthylène (Dominguez-Puigjaner et al., 1997). Laskowski et ses collaborateurs montrent que l'expression de deux PL, *AtPLA1/PLL26* et *AtPLA2/PLLI6*, augmente dans la racine après l'apport d'auxine (Laskowski et al., 2006). Une étude montre également que l'activité d'une pectate lyase *ZePel* de *Zinnia elegans* est activée par la présence d'auxine (Domingo et al., 1998). Palusa et ses collaborateurs ont testés l'effet de trois hormones : l'auxine, la cytokinine et l'acide abscisic, sur l'expression de l'ensemble des PL d'*Arabidopsis* sur plantules. L'auxine induit une augmentation du niveau d'expression de quatre PL : *PLLI1*, *12*, *13* et *23* et une réduction du niveau d'expression des *PLL9* et *16* (Palusa et al., 2007). La cytokinine induit une augmentation du niveau d'expression de plusieurs PL et une réduction du niveau d'expression de deux PL alors que l'acide abscisic réprime l'expression de nombreuses PL (Palusa et al., 2007). De plus, les conditions environnementales telles que des conditions de température élevé ou basse, réduise l'expression d'une ou de plusieurs PL (Palusa et al., 2007).

2- Les "arabinogalactan protein" (AGP)

Les arabinogalactanes protéines (AGP) appartiennent à une grande famille de glycoprotéines, les "highly glycosylated hydroxyproline-rich glycoproteins" (HRGP). Les HRGP sont divisées en trois classes : les "Pro-rich proteins" (PRP) peu glycosylées, les extensines modérément glycosylées et les AGP fortement glycosylées. Les AGP sont composées d'une chaîne principale riche en hydroxyproline liée à des polysaccharides.

Certaines possèdent un domaine carboxy-terminal prédit comme étant une région de type glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) identifié comme le point d'ancrage de la protéine à la surface de la membrane plasmique (Ferguson and Williams, 1988; Sun and van Nocker, 2010).

Chez *Arabidopsis*, *AGP6* et *AGP11*, ont été identifiés comme étant spécifiques du grain de pollen et du tube pollinique (Pereira et al., 2006). Des lignées RNAi avec des niveaux d'expression d'*AGP6* et d'*AGP11* réduits présentent des tubes polliniques réduits, ce qui suggère que les AGP seraient nécessaires à la croissance du tube pollinique (Levitin et al., 2008). La surexpression du gène *CsAGP1* (*Cucumis sativus*) chez le tabac promeut la croissance de la tige et inversement la mutation du gène *AGP19* chez *Arabidopsis* engendre une diminution de la taille de la tige (Park et al., 2003; Yang et al., 2007). La lignée transgénique dont le niveau de *GhAGP4* (*Gossypium herbaceum*) est réduit montre une réduction de l'initiation et de l'élongation des fibres de coton (Li et al., 2010). La surexpression de *LeAGP1* (*Lycopersicon esculentum*) chez la tomate montre une augmentation du nombre de ramifications et de boutons floraux (Sun et al., 2004). Ces données suggèrent que les AGP seraient impliquées dans l'initiation et la croissance des organes. Chez *Arabidopsis*, la taille moyenne des cellules de l'épiderme de l'hypocotyle et des feuilles de la rosette est réduite chez le mutant *agp19* par rapport à une plante sauvage (Yang et al., 2007). Ceci suggère que les AGP activeraient l'élongation cellulaire. Le niveau d'expression de *CsAGP1* dans l'hypocotyle de concombre augmente en présence de gibbérelline ou d'auxine (Park et al., 2003). Le niveau d'expression de *LeAGP1* sur des plantules de tomates est augmenté en présence de cytokinine et diminué en présence d'auxine et d'acide abscissique (ABA) (Sun et al., 2004). Ces données suggèrent que les hormones pourraient contrôler le niveau d'expression des AGP.

3- Les Expansines

Plusieurs études sur une α -expansine, nommé *CsEXP1* (*Cucumis sativus*), isolée à partir de paroi cellulaire de concombre montrent que l'activité de *CsEXP1* induit une extension de la paroi (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; McQueen-Mason and Cosgrove, 1995; Whitney et al., 2000). *CsEXP1* n'altère pas la masse moléculaire des composants de la paroi ni la viscosité de la matrice polysaccharidique, suggérant que la *CsEXP* n'hydrolyse pas les pectines ou l'hemicellulose (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; McQueen-Mason and

Cosgrove, 1995). En effet, des études montrent que la CsEXP1 coupe les ponts hydrogènes entre des fibres de cellulose et des polysaccharides (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994). Plus tard, Whitney et ses collaborateurs montrent que l'expansine CsEXP1 induit l'extension d'un composant contenant des microfibrilles de cellulose et des xyloglucanes (un composant polysaccharidique de la paroi) mais non l'extension de composants contenant d'autres types de glycane, ce qui montre que l'enzyme CsEXP1 possède une grande spécificité pour son substrat (Whitney et al., 2000). Son activité dans le remodelage de la paroi est également renforcée par la localisation de la protéine dans la paroi cellulaire, en effet, la protéine CsEXP1 a été purifiée à partir d'extrait de paroi de concombre mais d'autres expériences montrent la localisation d'expansine *in vivo*, par exemple chez *Arabidopsis* où la protéine AtEXP7 fusionnée à la GFP est détectée dans la paroi cellulaire de cellules racinaires (Cho and Cosgrove, 2002). Le rôle de l'expansine dans la croissance a été démontré par de nombreuses expériences. L'induction locale de l'expression de l'expansine *CsEXP1* à la périphérie d'un méristème apical de tabac provoque la formation d'un renflement et au niveau de la marge de jeunes feuilles de tabac induit des excroissances et modifie la forme des feuilles (Pien et al., 2001). L'expression de deux expansines *AtEXP7* et *AtEXP18* chez *Arabidopsis* est impliquée dans l'initiation et l'élongation des poils racinaires et l'expression ectopique d'une expansine de *Glycine max*, *GmEXP1*, provoque un accroissement de la croissance racinaire sur des tabacs transgénique (Cho and Cosgrove, 2002; Lee et al., 2003). Deux études ont montrées que les expansines putatives *VIEXP1* et *VIEXP2* chez le raisin et *CmEXP1* chez le melon sont surexprimées au cours de la maturation du fruit (Ishimaru et al., 2007; Nishiyama et al., 2007). Ces données suggèrent que les expansines seraient impliquées dans la maturation du fruit. L'analyse phylogénétique des expansines d'*Arabidopsis* montre que cette famille est divisée en quatre sous-groupes : EXPA (α -EXPANSIN), EXPB (β -EXPANSIN), EXLA (α -EXPANSIN LIKE) et EXLB (β -EXPANSIN LIKE) (Kende et al., 2004). Cho et Cosgrove montrent que le niveau d'expression de deux expansines *AtEXP7* et *AtEXP18* est augmenté en présence d'auxine ou d'éthylène (Cho and Cosgrove, 2002). Chez *Sambucus nigra*, le niveau d'expression des expansines *SniEXP2* et *SniEXP4* est augmenté en présence d'éthylène (Belfield et al., 2005). De plus Overvoorde et ses collaborateurs montrent que le niveau d'expression d'*AtEXP15* et d'*AtEXP18* est réduit chez un mutant *axr3*, mutant où la réponse à l'auxine est inhibée (Overvoorde et al., 2005). Les expansines peuvent être activées par l'apport d'auxine ou d'éthylène.

En conclusion la paroi cellulaire apporte un soutien structurel à la cellule et à la plante qui est dépourvue de squelette. Cependant, elle fait également obstacle à la croissance. La croissance de la cellule est permise par la pression de turgescence et la diminution de la rigidité de la paroi. Afin de contrôler leurs croissances les cellules doivent contrôler la rigidité de leurs parois à l'aide d'enzyme qui remodelent la paroi.

Objectif de la thèse

Chez *Arabidopsis*, le carpelle se développe en réponse à l'expression de deux classes de gènes homéotiques, *AGAMOUS* (*AG*) et *SEPALLATA* (*SEP*) qui codent des facteurs de transcription à boîte MADS (Pelaz et al., 2000; Yanofsky et al., 1990). Outre ces facteurs déterminant l'identité du carpelle, d'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans son développement. Parmi ces facteurs, *ETTIN* (*ETT*), appartenant à la famille des ARF, détermine les limites apicales et basales de l'ovaire (Sessions and Zambryski, 1995); *CRABS CLAW* (*CRC*), appartenant à la famille YABBY, et *SPATULA* (*SPT*), facteur de transcription de type bHLH, contrôlent la fusion apicale du carpelle ainsi que le développement du style et du stigmate (Alvarez and Smyth, 1999). *CRC* contrôle également en synergie avec d'autres facteurs de transcription, la mise en place de la polarité abaxiale/adaxiale de l'ovaire. L'objectif de l'équipe était de construire un modèle de régulation transcriptionnelle opérant durant le développement du carpelle. Pour cela, l'équipe a choisi d'identifier les gènes cibles directes d'*ETT*, *CRC* et *SPT*, trois facteurs de transcription contrôlant différents aspects du développement du carpelle. En effet, pour comprendre comment ces facteurs de transcription contrôlent la morphogenèse du carpelle, il est essentiel de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels ils contrôlent les gènes effecteurs, c'est-à-dire les gènes directement impliqués dans les processus cellulaires tels que la division, l'expansion ou la différenciation cellulaire.

30

Dans un premier temps, l'équipe a produit des lignées transgéniques exprimant des versions inductibles de ces trois protéines. Ceci nous a permis d'obtenir une liste de gènes cibles directs putatifs pour chacun des trois facteurs de transcription. L'analyse des résultats obtenus avec *CRC* et *SPT* a été réalisée au cours de la thèse de Mathieu REYMOND et l'objectif de ma thèse a été d'analyser les résultats obtenus avec *ETT*.

Lorsque je suis arrivée dans l'équipe pour mon stage de Master, l'objectif était d'identifier des interacteurs protéiques potentiels du facteur de transcription *CRC* par co-immunoprécipitation *in planta*. Lorsque j'ai commencé ma thèse, mon objectif était de poursuivre l'identification des interacteurs protéiques de *CRC* et d'analyser les domaines fonctionnels de ce facteur de transcription. Cependant, nous avons assez rapidement décidé de changer d'objectif pour des raisons stratégiques et d'exploiter la liste de gènes cibles putatifs d'*ETT*. Parmi ces cibles, deux catégories ont retenu notre attention : des gènes impliqués dans

la voie de signalisation de l'auxine et des gènes codant des enzymes de remodelage de la paroi. Mon projet a consisté à essayer de comprendre l'implication de ces régulations transcriptionnelles dans le développement du gynécée. En parallèle, j'ai essayé de tirer partie de la disponibilité dans l'équipe d'un nouveau senseur d'auxine pour essayer de comprendre le rôle de cette hormone et de sa répartition spatio-temporelle dans le développement du gynécée.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

NON-LIBRE DE DROIT

Figure I-1 : Phénotype de différents allèles d'*ettin*.

Les gynécées après pollinisation ont été observées en microscopie électronique à balayage (A) sauvage et (B-D) mutant homozygote pour différents allèles *ettin*. Les limites apicales et basales de l'ovaire sont indiquées par les flèches blanches. La barre d'échelle représente : (A) 153µm, (B) 109µm, (C) 295µm et (D) 132µm (d'après Sessions et Zambryski, 1995).

NON-LIBRE DE DROIT

Figure I-2 : Analyse de l'allèle fort *ett-1*.

(A) Structure du gène *ETT* et position des insertions T-DNA de l'allèle fort *ett-1* et de deux allèles faibles *ett-22* et *ett-13*. Les régions A et B correspondent aux sites de reconnaissance d'un tasiR-ARF (Allen et al., 2005). La ligne noire correspond à la construction *ETT-N150* produisant la protéine tronquée putative de l'allèle *ett-1*. (B) Gynécée d'un mutant *ett-13* et (C) gynécée d'un mutant *ett-13* exprimant la construction *ETT-N150* (d'après Pekker et al., 2005).

I-Identification des cibles d'ETT et d'ARF4

Le gène *ETT* est impliqué dans de nombreux processus développementaux mais sa mutation affecte principalement la morphogenèse du carpelle. En effet, des mutations dans le gène *ETT* induisent une diminution de la taille de l'ovaire qui peut aller jusqu'à une disparition totale par exemple chez l'allèle fort *ett-1* (Figure I-1D). La diminution de l'ovaire est compensée par une extension du gynophore. Les papilles stigmatiques peuvent également se développer le long du gynécée et les ovules normalement enfermés à l'intérieur de l'ovaire se développent ponctuellement à l'extérieur (Figure I-1C, D). Ces phénotypes montrent qu'ETT contrôle à la fois l'axe de polarité apico-basale et l'axe de polarité adaxiale-abaxiale du gynécée. Le mutant *ett* présente également une réduction du nombre d'organes floraux et des problèmes de phyllotaxie (Pfluger and Zambryski, 2004; Sessions et al., 1997). De plus, des travaux ont montré qu'*ARF2*, *ETT* et *ARF4* sont impliqués dans la croissance des racines latérales (Marin et al., 2010; Yoon et al., 2010). La surexpression du gène *ETT* induit également une accélération de la transition de la phase juvénile à la phase adulte des feuilles de la rosette (Hunter et al., 2006). L'allèle fort *ett-1*, ne correspond sans doute pas à une perte de fonction. Il produit une protéine d'environ 120 acides aminés correspondant à la partie N-terminale d'ETT (Figure I-2A). Ainsi, comme le montre la figure I-2C la surexpression de cette protéine tronquée chez un allèle *ett* faible induit un phénotype fort (Pekker et al., 2005). Ceci suggère que cette protéine tronquée pourrait interférer avec la voie contrôlée par *ETT*. De façon intéressante, le phénotype du mutant *ett* est très accentué par la mutation du gène *ARF4*. En effet, chez le double mutant *ett arf4*, la taille de l'ovaire est fortement réduite voire inexistante et les feuilles de rosette présentent un défaut de polarité abaxiale/adaxiale qui n'est pas observé chez les simples mutants (Pekker et al., 2005). Ceci suggère qu'ETT et ARF4 fonctionnent ensemble dans le contrôle du développement du carpelle et de la mise en place de la polarité abaxiale-adaxiale des feuilles de rosette. L'analyse des séquences d'acides aminés d'ETT et d'ARF4 suggère qu'ils possèdent une activité transcriptionnelle répressive. Contrairement à ARF4, ETT ne possède pas les domaines de dimérisation aux Aux/IAA suggérant que son activité transcriptionnelle ne dépendrait pas des Aux/IAA et donc du niveau d'auxine. Leurs patrons d'expression sont très proches, notamment dans le carpelle. Au sein de la famille des ARF, *ETT* et *ARF4* sont les plus proches paralogues (Liscum and Reed, 2002). De plus, les séquences codantes d'*ETT* et *ARF4* possèdent deux sites de reconnaissance à un petit ARN tasiR-ARF, en position C-terminale (Figure I-2A) et cette

interaction induit un clivage des transcrits (Allen et al., 2005; Williams et al., 2005). Afin de comprendre comment ETT contrôle le développement du gynécée, l'objectif de l'équipe a été d'identifier ses gènes cibles directs. Pour cela, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 transgéniques exprimant une version inductible de la protéine ETT (fusion avec le domaine de liaison au ligand du récepteur aux glucocorticoïdes de rat (GR)) sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (p35S) ont été produites. En absence de ligand, les protéines chimères sont séquestrées dans le cytoplasme par des protéines chaperons. En présence de ligand ou d'un analogue comme la dexaméthasone, le domaine GR interagit avec le ligand, ce qui libère la protéine chimère qui peut alors entrer dans le noyau, se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles et activer ou inhiber leur transcription. L'utilisation de cycloheximide permet de bloquer la traduction et donc d'identifier potentiellement uniquement les cibles directes. Les inflorescences des plantes transgéniques ont été traitées soit avec de la dexaméthasone et de la cycloheximide soit seulement avec de la cycloheximide. Les ARN ont ensuite été hybridés sur une puce à ADN afin d'identifier les gènes dont l'expression était soit induite soit réprimée suite à l'induction de la protéine ETT-GR. Pour palier à d'éventuels artéfacts liés à une induction transcriptionnelle non spécifique suite à la translocation massive de protéines chimères dans le noyau, une plante transgénique exprimant la protéine NLS-VP16-GR (où la séquence codant le facteur de transcription a été remplacée par une séquence d'adressage au noyau (NLS pour Nuclear Localization Signal) et par le domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 du virus *herpes simplex* a été utilisée comme témoin. L'analyse des résultats combinés de trois expériences d'induction indépendantes montrent que certains gènes ont une expression différentielle entre des conditions d'induction et de non induction de l'activité d'ETT. Afin d'obtenir une liste de gènes cibles putatifs pour ETT, les gènes ayant une expression différentielle associée à une valeur statistique de type p-value inférieure à 0,005 ont été sélectionnés. Cette liste de 92 gènes cibles directes putatives était disponible à mon arrivée (Annexe 1).

L'analyse pour chaque gène du ratio entre le niveau d'expression dans la condition induite et non-induite du facteur de transcription ETT montre que 76% des gènes ont une expression diminuée suite à l'induction d'ETT et 24% ont une expression augmentée. Cette première observation est donc cohérente avec les données de la bibliographie qui prédisent qu'ETT, ARF riche en sérine, présenterait une activité transcriptionnelle majoritairement inhibitrice (Guilfoyle and Hagen, 2007). Parmi la liste, on compte trois gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine : *IAA6* (*AT1G52830*), *IAA17* (*AT1G04250*) et *BT2* (*AT3G48360*),

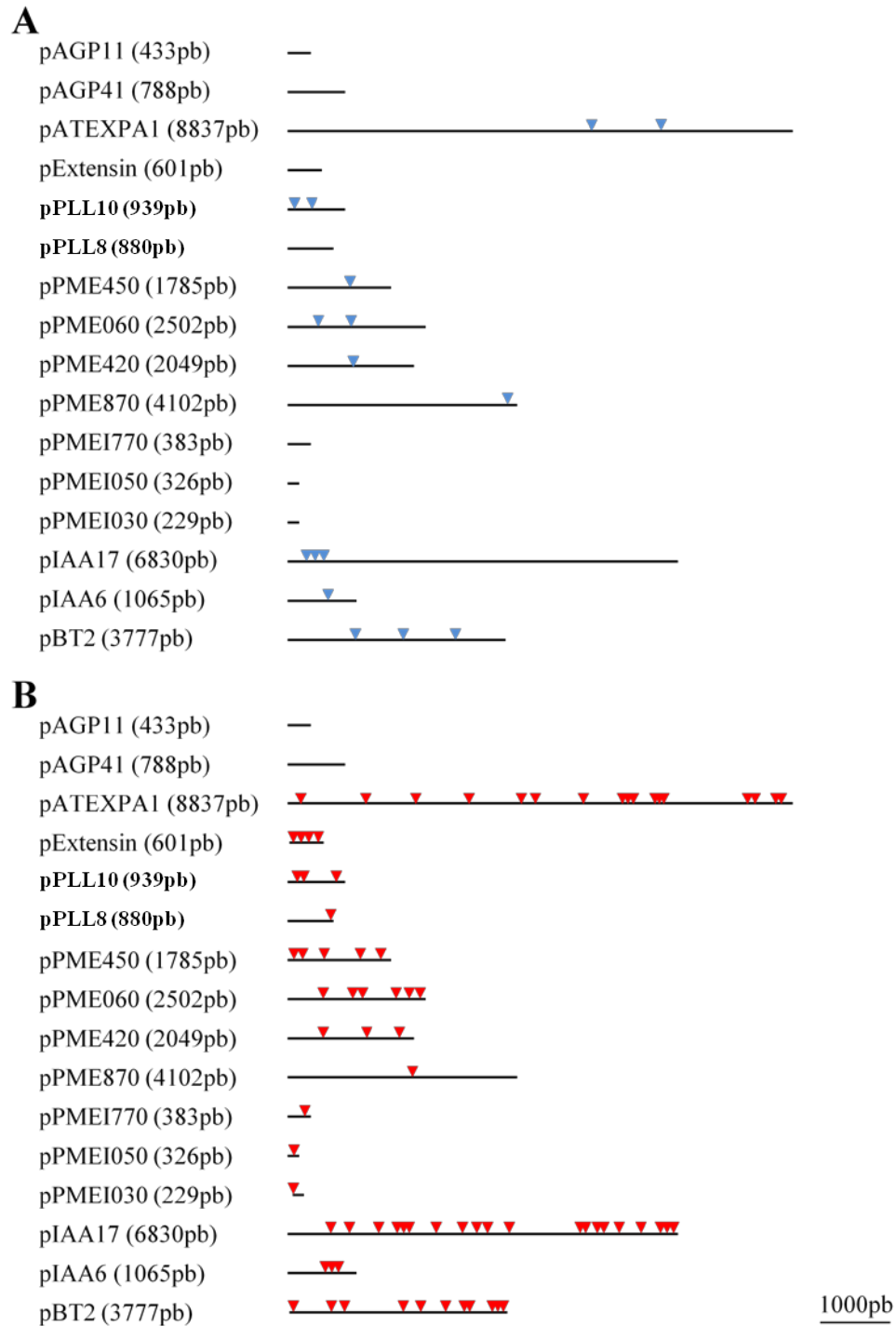


Figure I-3 : Recherche d'AuxRE dans les promoteurs des gènes cibles.

Les promoteurs (séquence en amont de l'ATG jusqu'au gène précédent) de seize gènes cibles d'ETT sont représentés avec l'emplacement (A) des motifs AuxRE TGTCTC (triangles bleus) et (B) des motifs AuxRE dégénérés TGTCTN ou TGTCNC (triangles rouges).

un facteur de réponse à l'éthylène *ERF108* (*AT1G43160*), un gène impliqué dans la voie de signalisation de l'acide salicylique *WRKY38* (*AT5G22570*), un gène codant la cycline *CYCD7.1* (*AT5G02110*) et treize gènes codant des enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi : deux pectate lyases : *PLL8* (*AT1G14420*) et *PLL10* (*AT3G01270*), deux "Arabinogalactan-protein" (AGP) : *AGP11* (*AT3G01700*) et *AGP41* (*AT5G24105*), une extensine (*AT1G29140*), une expansine *ATEXPA1* (*AT1G69530*), quatre pectine méthylestérases (PME) : *PME420* (*AT5G07420*), *PME060* (*AT3G17060*), *PME450* (*AT2G26450*) et *PME870* (*AT5G27870*) dont deux possèdent un domaine PRO et trois inhibiteurs de PME (PMEI) : *PMEI030* (*AT5G50030*), *PMEI050* (*AT2G47050*) et *PMEI770* (*AT1G10770*). Parmi les autres gènes, vingt-cinq n'ont pas de fonction connues et les autres codent des protéines très diverses.

Nous avons vu précédemment que l'auxine et le remodelage de la paroi peuvent modifier l'organogenèse et notamment la morphogenèse du gynécée, c'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser aux trois gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine et aux treize gènes codant des enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi. Mon objectif a été de comprendre la signification biologique de ces interactions. J'ai également tenté de savoir si, comme on pourrait s'y attendre, ETT et ARF4 régulent l'expression des mêmes gènes cibles.

A- Recherche de motifs conservés

ETT appartenant à la famille des ARF, j'ai cherché dans les promoteurs (séquence en amont de l'ATG jusqu'au gène précédent) de ses gènes cibles putatifs la présence de motif AuxRE (TGTCTC) qui correspond à la séquence consensus de liaison à l'ADN des ARF (Ulmasov et al., 1995). Sur la figure I-3 les triangles représentent l'emplacement de motif AuxRE (orientation sens ou antisens) sur les promoteurs des gènes cibles putatifs schématisés par une ligne horizontale noire. On remarque que seulement neuf promoteurs sur seize contiennent au moins un motif AuxRE et que les promoteurs ne contenant pas de motif AuxRE sont les promoteurs les plus courts. Statistiquement, une séquence donnée de 6pb apparaît, aléatoirement, tous les 1296pb (6^4). On remarque que seul le promoteur du gène *PLL10* présente un enrichissement de cette séquence avec deux AuxRE pour 940pb. On obtient donc des résultats assez faibles sur la fréquence d'apparition de ce motif dans les promoteurs des gènes cibles putatifs. Cependant Ulmasov et ses collaborateurs ont montré

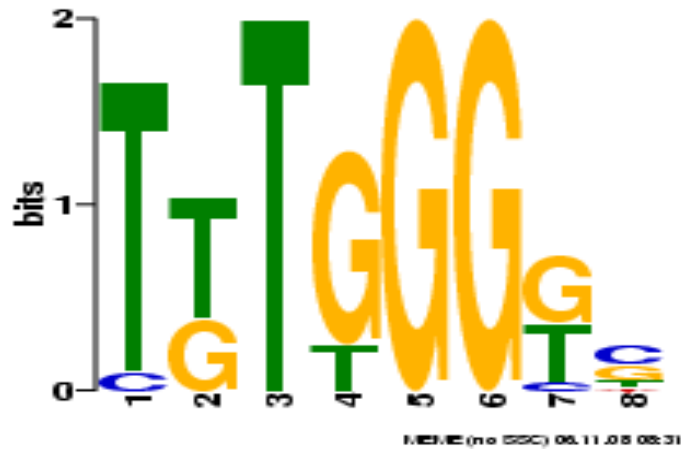


Figure I-4 : Recherche de motifs consensus dans les promoteurs des gènes cible d'ETT.

Les promoteurs des seize gènes cibles d'ETT (les mêmes que dans la Figure I-3) ont été analysés avec le programme MEME (Multiple Em for Motif Elicitation; http://meme.nbcr.net/meme4_6_1/cgi-bin/meme.cgi). La séquence consensus obtenue est représentée. La taille de chaque base représente sa probabilité d'apparition pour chaque position. Pour l'ensemble des promoteurs, on obtient une p-value inférieure à 0,0005.

grâce à des expériences de retard sur gel, qu'ETT présente une affinité importante pour les quatre premières bases et très faible pour les deux dernières bases (Ulmasov et al., 1999b). Pour cette raison, j'ai recherché un motif AuxRE dégénéré au niveau d'une des deux dernières bases, c'est-à-dire soit TGTCTN soit TGTCNC, que j'ai appelé AuxREd. La figure I-3B montre les résultats de cette recherche. Les triangles rouges indiquent l'emplacement de ces motifs sur les promoteurs des gènes cibles putatifs schématisés par une ligne horizontale noire. La fréquence d'apparition de ces deux motifs est statistiquement de 2 motifs tous les 625pb (5^4) soit un motif tous les 312pb. On constate que le promoteur des gènes *AGP11* (434pb) et *AGP41* (789pb) ne présente ni de motif AuxRE complet ni de motif AuxREd. Les promoteurs des gènes *EXT* et *PLL10* comptent respectivement un motif tous les 150pb et 188pb, ces motifs sont donc sur-représentés. Les promoteurs des gènes *PME450*, *PME030*, *IAA17*, *IAA6* et *BT2* présentent une légère sur-représentation des motifs AuxREd avec une fréquence légèrement inférieure à un motif tous les 312pb. Les promoteurs des gènes *ATEXPA1*, *PME060* et *PME420* comptent respectivement un motif tous les 465pb, 312pb et 512pb, résultat légèrement supérieur à la fréquence d'apparition aléatoire de ces motifs. Enfin les promoteurs des gènes *PLL8* et *PME870* comptent respectivement un motif AuxREd tous les 881pb et 2051pb, ces motifs apparaissent sous-représentés. Pour conclure, on constate que seul un promoteur sur 16 présente une sur-représentation du motif AuxRE et que seulement 7 promoteurs présentent une sur-représentation des motifs AuxREd. De plus, les promoteurs des gènes *AGP11* et *AGP41* ne contiennent ni AuxRE ni AuxREd. Les promoteurs des gènes *AGP11* et *AGP41* présentent en revanche respectivement un et deux motifs TGTC. La fréquence d'apparition de ce motif est de un tous les 256 pb, or la taille des promoteurs des gènes *AGP11* et *AGP41* est respectivement de 434pb et de 789pb. Même ce petit motif est donc sous-représenté dans le promoteur de ces gènes.

Afin d'identifier d'autres motifs conservés, j'ai analysé les treize promoteurs des gènes cibles putatifs à l'aide du programme MEME (Multiple Em for Motif Elicitation), un logiciel de recherche de motifs consensus (utilisable sur l'adresse <http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>). Ceci nous a permis d'identifier un motif consensus présent sur l'ensemble des promoteurs (Figure I-4) et dont les p-values pour chacun des promoteurs testés n'excède pas 0,0004. On obtient un motif de 8 paires de bases composé majoritairement de thymines et de guanines. On remarque que le T en troisième position et que les deux G en cinquième et sixième position sont conservés chez tous les promoteurs. Le T en première position et le G en quatrième ont une fréquence d'apparition très forte, ils sont



Figure I-5 : Patron d'expression d'*ETT* dans des inflorescences sauvages.

Hybridations *in situ* avec la sonde *ETT* sur des coupes longitudinales d'inflorescences sauvages de l'écotype Col-0 au niveau (A) du méristème d'inflorescence, et de fleurs au stade 1 (P1), au stade 3 (P3), (B) au stade 2 (P2), (C) au stade 5, (D) au stade 6, (E) au stade 7 précoce, (F) au stade 7 tardif, (G) au stade 10 et (H) au stade 12. La barre d'échelle représente 50µm.

présents respectivement chez 12 et 10 promoteurs. En deuxième position on remarque que la fréquence d'apparition d'un T est légèrement supérieure à celle d'un G, on les retrouve respectivement dans 8 et 5 promoteurs, alors qu'en septième position la fréquence d'apparition est presque identique avec 5 et 6 promoteurs. Enfin, au niveau de la dernière position on ne remarque pas de base ayant une fréquence d'apparition forte, ce qui suggère que cette position pourrait être moins importante que les autres. Ces données suggèrent que la séquence consensus reconnue par ETT pourrait être : TT/GTT/GGGT/G. Des analyses complémentaires sont bien entendu nécessaires pour s'assurer de l'existence et du rôle de cette séquence.

B- Caractérisation de plantes dont l'expression d'*ETT* est modifiée

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différentes lignées présentant une modification du niveau d'expression d'*ETT* et/ou d'*ARF4*. Ces lignées ont été analysées en détails au niveau moléculaire et phénotypique et les résultats sont présentés ici. Au préalable, nous avons effectué une analyse détaillée du patron d'expression d'*ETT* et *ARF4* dans les inflorescences de plantes sauvages.

37

1- Patron d'expression d'*ETT* et *ARF4* au cours du développement floral

Les patrons d'expression d'*ETT* et *ARF4* ont été déterminés par hybridation *in situ* sur des inflorescences sauvages de l'écotype Col-0. Les résultats présentés sur la figure I-5 montrent qu'au niveau du méristème d'inflorescence, l'expression d'*ETT* est localisée dans les initia puis dans les primordia floraux aux stades 1 et 2 et les tissus vasculaires. Au stade 3, le signal est présent dans l'ensemble du méristème floral. Aux stades 6, 7, 10 et 12, *ETT* s'exprime dans la zone abaxiale du gynécée. Au stade 6 on remarque également une expression au niveau des primordia d'étamines. Au stade 12, *ETT* est exprimé dans le filet et le sac pollinique des étamines, dans les ovules et dans les tissus vasculaires. Le signal en hybridation *in situ* sur les stades précoces de développement floral (stade 1 à 6) est très intense et semble moins intense à partir du stade 7. Son expression dans les tissus vasculaires reste par contre très intense tout au long du développement.

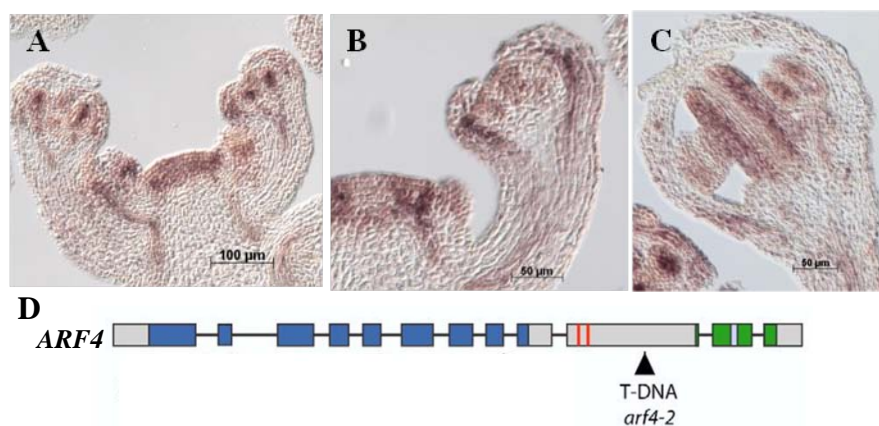


Figure I-6 : Patron d'expression d'*ARF4* dans des inflorescences sauvages et localisation de l'insertion T-DNA chez le mutant *arf4-2*.

(A-C) Hybridations *in situ* avec la sonde *ARF4* sur des coupes longitudinales d'inflorescences sauvages de l'écotype *col-0* au niveau (A) du méristème d'inflorescence, (B) de fleur au stade 4 et (C) au stade 7. (D) Représentation schématique de la structure génomique du gène *ARF4* avec la position de l'insertion du T-DNA chez l'allèle *arf4-2*. Les exons sont représentés par les rectangles, la couleur bleue correspond au domaine de liaison à l'ADN ; les traits rouges, aux sites de reconnaissance du tasiR-ARF ; la couleur verte aux domaines III et IV. La position de l'insertion du T-DNA est représentée par un triangle.

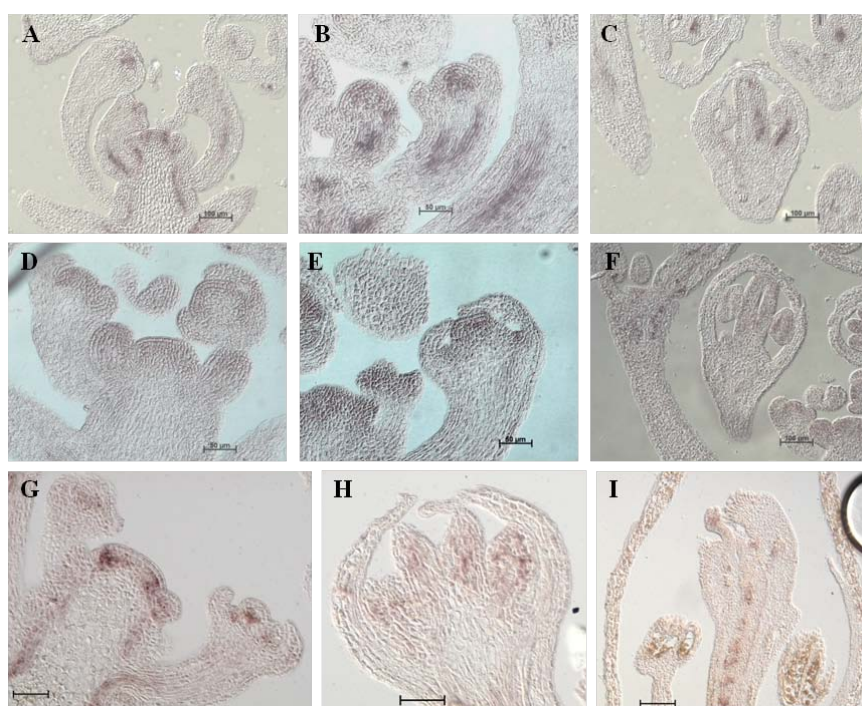


Figure I-7 : Patron d'expression d'*ETT* dans des inflorescences de mutants *ett-13*, *ett-22* et *arf4-2 ett-13*.

Hybridations *in situ* avec la sonde *ETT* sur des coupes longitudinales d'inflorescences (A-C) de mutant *ett-13*, (D-F) de mutant *ett-22* et (G-I) de double mutant *arf4-2 ett-13*. (A, D, G) méristème d'inflorescence, (B) fleur au stade 3, (E) fleur au stade 5, (H) fleur au stade 7, (C, F) fleurs au stade 10 et (I) fleur au stade 12.

Le patron d'expression d'ARF4, présenté dans la Figure I-6, est similaire à celui d'ETT. Ces résultats sont cohérents avec l'idée que ces gènes fonctionnent ensemble et qu'ils seraient au moins partiellement redondants.

2- Caractérisation moléculaire des lignées utilisées

Nous avons ensuite caractérisé les plantes dont le niveau d'expression d'ETT et/ou ARF4 est perturbé. Comme nous l'avons vu précédemment, l'allèle fort *ett-1* ne semble pas correspondre à une perte de fonction. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser deux allèles mutants d'*ett* considérés comme nuls : *ett-13* et *ett-22* (Pekker et al., 2005). Nous avons également utilisé trois lignées surexprimant ETT et/ou ARF4 : p35S::ETT, p35S::ETTm et le mutant *rdr6-15* (*rna-dependent rna polymerase6-15*) (Allen et al., 2005; Hunter et al., 2006). La lignée p35S::ETT, réalisée dans l'équipe, comporte la séquence codante du gène ETT sous contrôle du promoteur fort constitutif p35S. La lignée p35S::ETTm nous a été envoyée par Scott Poethig et comporte la séquence codante du gène ETT muté au niveau des deux sites de reconnaissance du tasiR-ARF sous contrôle du promoteur p35S (Hunter et al., 2006). RDR6 code une enzyme impliquée dans la maturation des ta-siRNA et présente une absence de tasiR-ARF. . Ainsi, chez le mutant *rdr6-15*, le niveau d'expression d'ARF2, ARF3 et ARF4 ciblés par ce petit ARN, est augmenté par rapport à une plante sauvage (Allen et al., 2005).

Les allèles *arf4-2*, *ett-13* et *ett-22* ont tous été obtenus par insertion d'un T-DNA. Pour l'allèle *arf4-2*, l'insertion se situe dans le dixième exon entre les sites de reconnaissance au tasiR-ARF et les domaines de dimérisation III et IV (Figure I-6D) (Hunter et al., 2006). Pour les allèles *ett-13* et *ett-22*, l'insertion du T-DNA se situe 8pb en amont de l'ATG pour *ett-22* et à 18pb en aval de l'ATG pour *ett-13* (Figure I-2A). Nous avons quantifié le niveau d'expression relatif d'ETT sur ces lignées mutantes et avons montré que les mutants *ett-13* et *ett-22* ont un niveau d'expression respectif de 50% et 75% plus faible que chez une plante sauvage (Figure 1 de l'article). Nous avons également analysé le patron d'expression du gène ETT par hybridation *in situ* sur des inflorescences mutantes *ett-13*, *ett-22* et *arf4-2 ett-13*. Les résultats présentés sur la figure I-7 montrent que chez les mutants *ett-13* et *arf4-2 ett-13* on détecte un signal dont le patron est identique à celui identifié chez le sauvage mais l'intensité du signal est bien plus faible. Par contre, chez le mutant *ett-22*, on ne détecte pas de signal en hybridation *in situ*. Le niveau d'expression relatif d'ETT mesuré par RT-PCR quantitative sur

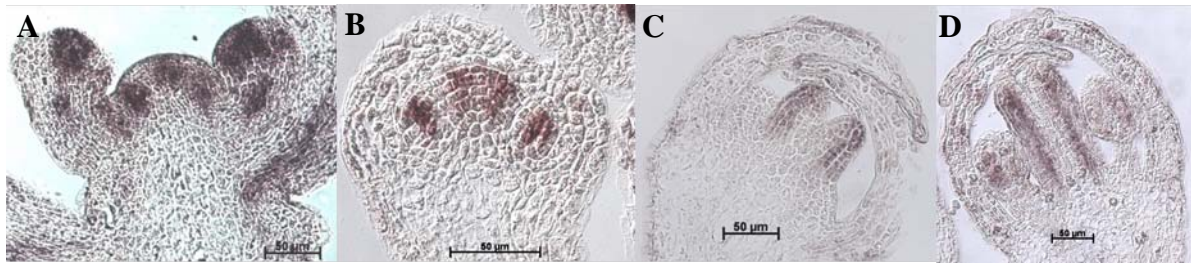


Figure I-8 : Patron d'expression d'*ETT* dans des inflorescences de plantes exprimant le transgène *p35S::ETTm*.

Hybridations *in situ* avec la sonde *ETT* sur des coupes longitudinales (A) de méristème d'inflorescence, (B) de fleur au stade 5, (C) de fleur au stade 7 précoce et (D) de fleur au stade 7 tardif exprimant le transgène *p35S::ETTm*. La barre d'échelle représente 50µm.

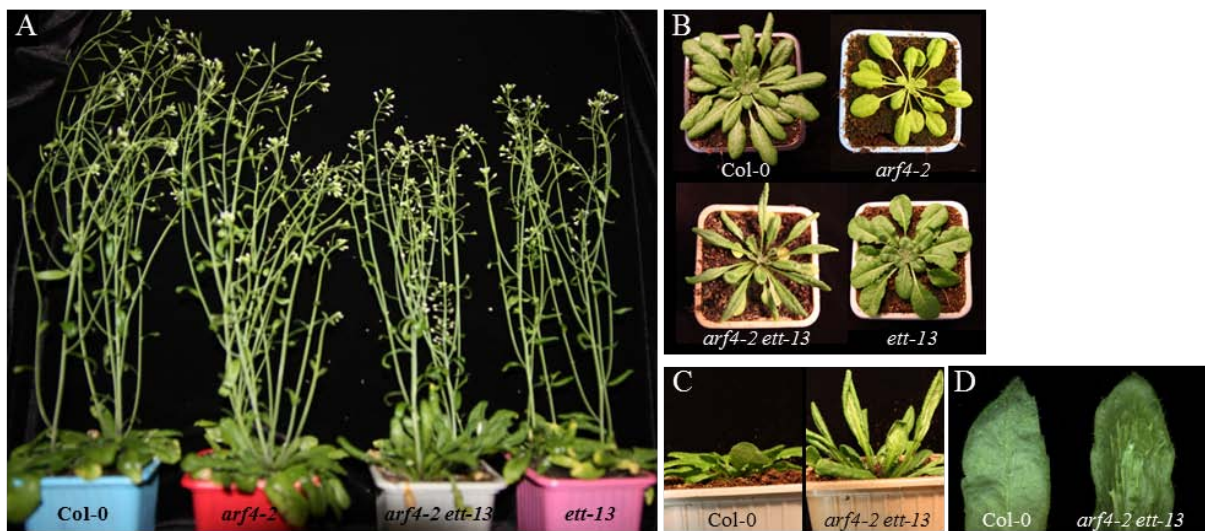


Figure I-9 : Phénotype des plantes mutantes *arf4-2*, *ett-13* et *arf4-2 ett-13*.

(A) Plantes matures col-0, *arf4-2*, *arf4-2 ett-13* et *ett-13*. (B) Vue de dessus des rosettes col-0, *arf4-2*, *arf4-2 ett-13* et *ett-13*. (C) Vue latérale des rosettes col-0 et *arf4-2 ett-13*. (D) Face adaxiale de feuilles de rosette col-0 et *arf4-2 ett-13*.

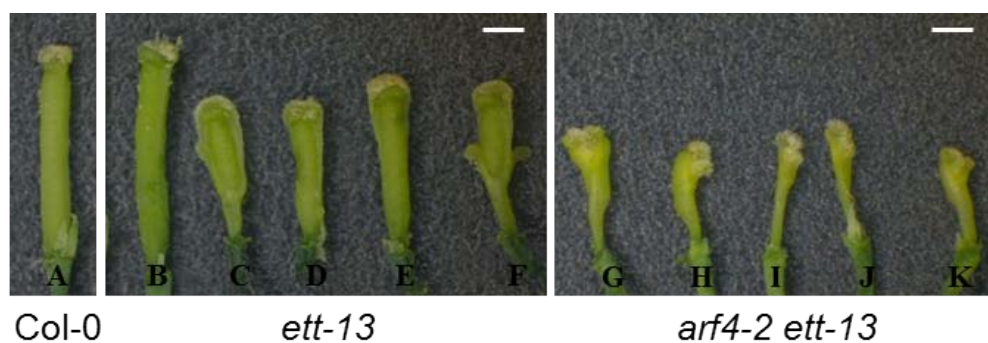


Figure I-10 : Variabilité des phénotypes des gynécées mutants *ett-13* et *arf4-2 ett-13*.

Gynécée (A) sauvage, (B-F) *ett-13* et (G-K) *arf4-2 ett-13*. La barre d'échelle représente 1mm.

les mutants *ett-13* et *ett-22* semble corrélé avec l'intensité du signal obtenu en hybridation *in situ* avec ces mutants.

Pour la lignée p35S::ETT, le niveau d'expression d'*ETT* mesuré par qRT-PCR est quatre fois supérieur au niveau mesuré chez une plante sauvage et pour la lignée p35S::ETT_m, le niveau d'expression d'*ETT* est plus de onze fois supérieur au niveau mesuré chez une plante sauvage (Figure 1 de l'article). De façon surprenante, le patron d'expression d'*ETT* sur des inflorescences de la lignée p35S::ETT (figure I-8) ne présente pas de différence de patron comparé à une inflorescence sauvage, cependant, l'intensité du signal semble plus importante. Ces résultats suggèrent que malgré une expression supposée ubiquitaire grâce au p35S, les transcrits d'*ETT* seraient dégradés par le tasiR-ARF dans les zones où le signal est absent. Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser pour la suite des analyses, la lignée dont la surexpression est la plus importante, c'est-à-dire p35S::ETT_m.

3- Caractérisation phénotypique des lignées utilisées

Nous avons enfin analysé le phénotype de ces plantes. Les plantes matures sauvages et mutantes *ett-13*, *arf4-2* et *arf4-2 ett-13* ne présentent pas de différence de taille majeure, bien que l'on puisse noter une légère diminution de la taille des plantes *ett-13* et *arf4-2 ett-13* (Figure I-9A). Alors que les feuilles de rosette des simples mutants *ett-13* et *arf4-2* ne présentent pas de phénotype notable, les feuilles de rosette du double mutant *arf4-2 ett-13* sont enroulées sur elles-mêmes (Figure I-9B-C). Elles présentent également sur la face abaxiale, des excroissances associées à une adaxialisation des feuilles (Figure I-9D). Ceci suggère que les gènes *ETT* et *ARF4* sont redondants pour déterminer la mise en place de la polarité abaxiale-adaxiale des feuilles de la rosette.

Au niveau du gynécée, le mutant *arf4-2* présente également un phénotype sauvage. Par contre, le mutant *ett-13* présente des valves qui peuvent être légèrement ou fortement réduites comme nous pouvons le voir sur la figure I-10. De plus, nous constatons que les papilles stigmatiques peuvent se développer sur une zone restreinte à l'apex du carpelle comme sur la figure I-10A, ou sur une zone beaucoup plus large avec un envahissement du style (figure I-10D) ou du replum (figure I-10C, I-10F). Le phénotype du mutant *ett-13* présente une grande variabilité. Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'allèle *ett-22*. On constate que le double mutant *arf4-2 ett-13* possède également une réduction de la taille des valves (Figure I-10G) et parfois une réduction du nombre de valves. En effet, on remarque

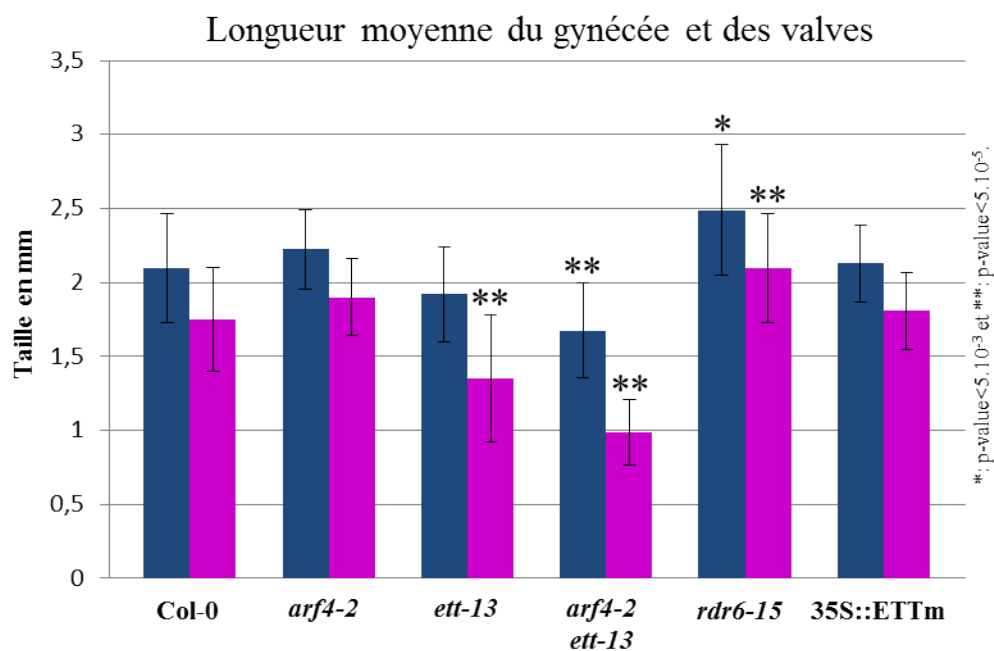


Figure I-11 : Longueur moyenne du gynécée et des valves au stade 12.

Histogramme représentant la longueur moyenne du gynécée (bleu) et des valves (rose) de plantes Col-0, *arf4-2*, *ett-13*, *arf4-2 ett-13*, *rdr6-15* et 35S::ETTm.

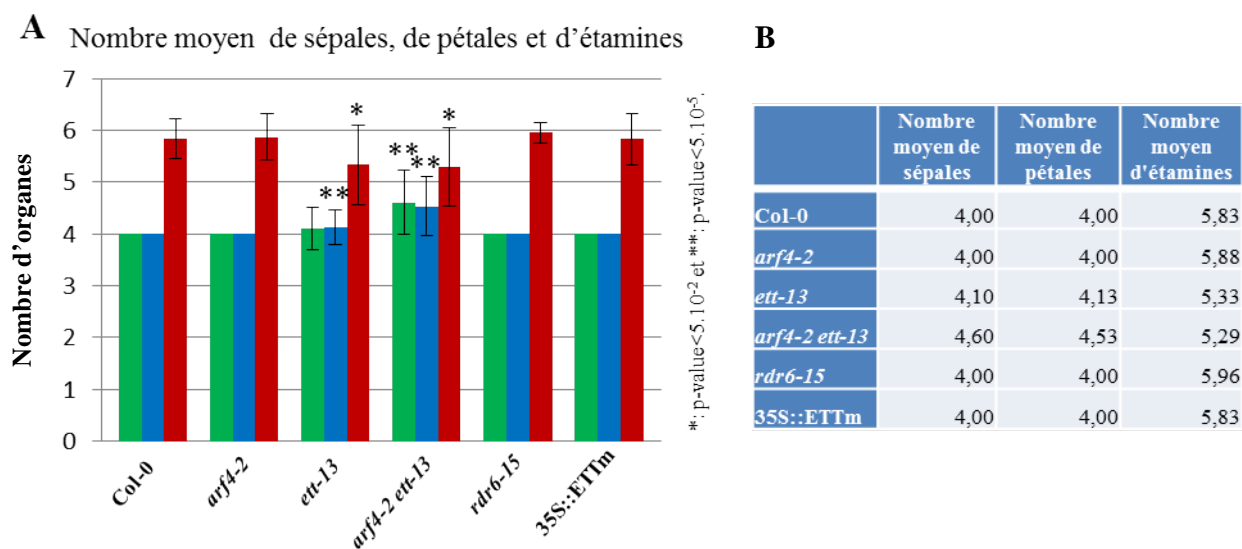


Figure I-12 : Nombre moyen de sépales, de pétales et d'étamines.

(A) Histogramme représentant le nombre moyen de sépales (vert), de pétales (bleu) et d'étamines (rouge) chez les plantes Col-0, *arf4-2*, *ett-13*, *arf4-2 ett-13*, *rdr6-15* et 35S::ETTm. (B) Valeurs moyennes du nombre de sépales, de pétales et d'étamines chez ces mêmes plantes.

que les gynécées H et K de la figure I-10 ne possèdent qu'une seule valve et parfois une absence de valve comme nous pouvons le voir sur les gynécées I et J de la figure I-10. On constate également un débordement des papilles stigmatiques sur la Figure I-10J. Le phénotype du carpelle du double mutant présente également une grande variabilité, mais est clairement plus drastique que le phénotype du simple mutant *ett*. Ces observations confirment l'aggravation du phénotype d'*ett* par la mutation d'*ARF4*. Enfin, les plantes *rdr6-15* et *p35S::ETTm* présentent un phénotype carpellaire sauvage.

Nous avons également mesuré la taille (longueur et largeur) des gynécées au stade 12 (figure I-11) sur différents génotypes. La longueur moyenne du gynécée et des valves de plantes sauvages, *arf4-2* et *p35S::ETTm* ne sont pas significativement différentes. Le mutant *ett-13* présente une légère diminution de la longueur moyenne du gynécée par rapport au gynécée d'une plante sauvage, cependant cette différence n'est pas significative. En revanche la longueur moyenne des valves du gynécée d'*ett-13* est significativement plus petite que celle d'une plante sauvage. Chez le double mutant *arf4-2 ett-13*, on constate que la longueur moyenne du gynécée et des valves est significativement diminuée par rapport à une plante sauvage. A l'inverse chez le mutant *rdr6-15* (sur-expresser d'*ETT* et d'*ARF4*) on constate que la longueur moyenne du gynécée et des valves est significativement augmenté par rapport à une plante sauvage. *ETT* et *ARF4* auraient donc une action partiellement redondante. En effet, la diminution de la taille du gynécée et des valves chez le mutant *ett-13* est amplifiée chez le double mutant *arf4-2 ett-13* alors que la taille n'est pas modifiée chez le mutant *arf4-2*.

40

Au niveau des autres organes floraux, on remarque sur la figure I-12 que le nombre moyen de sépales, de pétales et d'étamines des lignées *arf4-2*, *rdr6-15* et *p35S::ETTm* n'est pas statistiquement différent par rapport au génotype sauvage. Le mutant *ett-13* présente un nombre moyen de sépales légèrement supérieur mais la différence avec la plante sauvage n'est pas significative. On remarque par contre une augmentation significative du nombre de pétales et une diminution significative du nombre d'étamines chez le mutant *ett-13*. Chez le double mutant *arf4-2 ett-13* on observe une augmentation du nombre de sépales et de pétales plus importante que chez le simple mutant *ett-13*. Malgré que la diminution du nombre d'étamines chez *ett-13* ne soit pas aggravée chez *arf4-2 ett-13*, la diminution des pièces florales stériles est plus importante chez le double mutant que chez le simple mutant suggérant qu'*ETT* et *ARF4* sont partiellement redondant dans la détermination du nombre des pièces florales stériles.

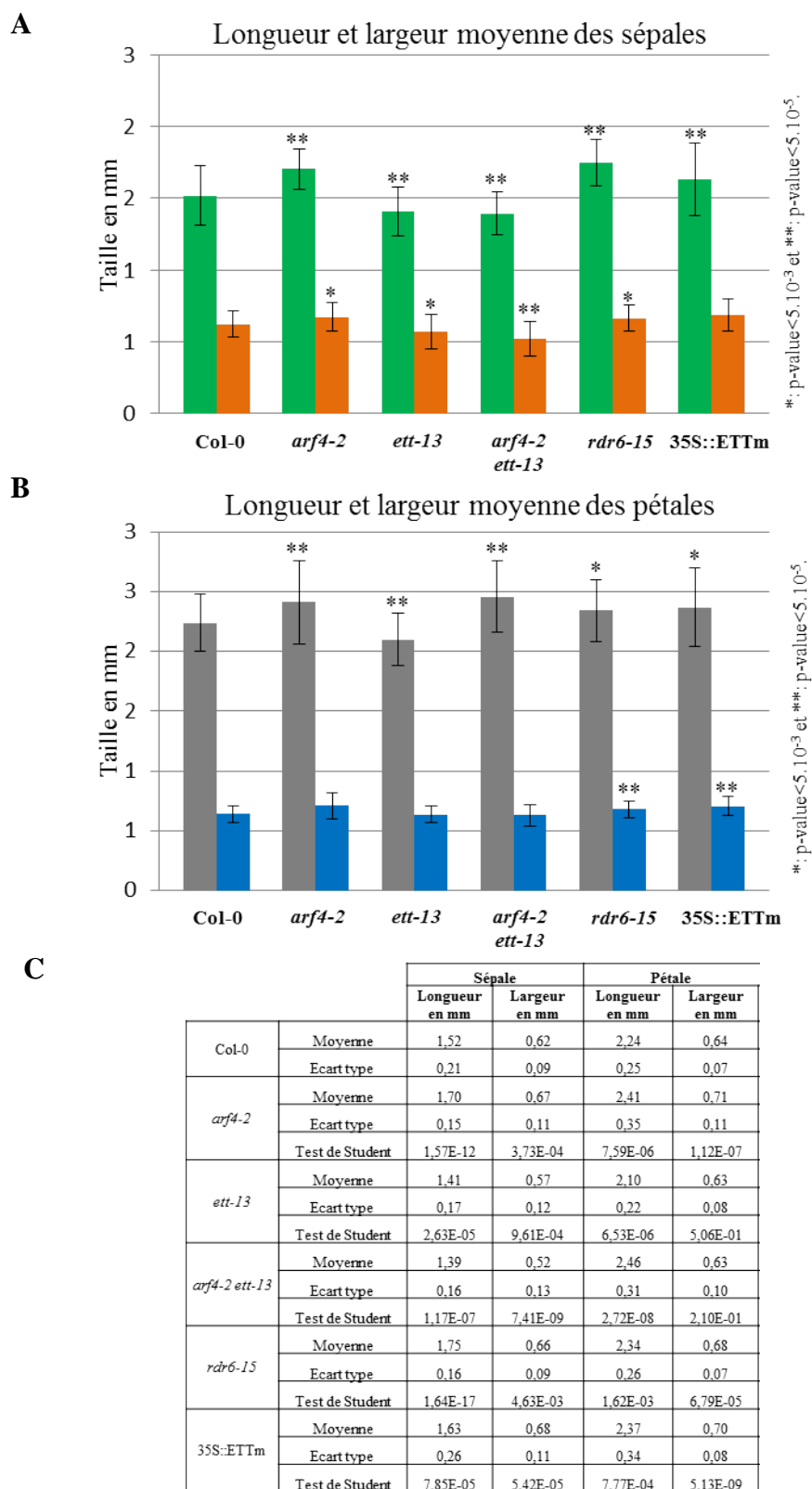


Figure I-13 : Longueur et largeur moyennes des sépales et des pétales.

(A-B) Histogrammes représentant (A) la longueur (vert) et la largeur (orange) des sépales et (B) la longueur (gris) et la largeur (bleu) des pétales Col-0, *arf4-2*, *ett-13*, *arf4-2 ett-13*, *rdr6-15* et 35S::ETTm. (C) Valeurs moyennes des longueur et largeur des sépales et des pétales.

La détermination de la longueur et de la largeur des sépales et des pétales semblent plus complexe (Figure I-13). En effet, on remarque que le mutant *arf4-2* présente une longueur et une largeur moyenne de sépales significativement plus grande que la plante sauvage alors que les résultats obtenus pour les mutants *ett-13* et *arf4-2 ett-13* montrent une diminution de la taille aggravée chez le double mutant. Concernant la longueur moyenne des pétales on constate que le mutant *arf4-2* présente également une augmentation significative de la longueur des pétales que l'on retrouve chez le double mutant *arf4-2 ett-13*. La longueur moyenne des pétales du mutant *ett-13* est significativement plus petite que celle d'une plante sauvage. Ces données suggèrent qu'*ARF4* inhiberait la croissance des sépales et des pétales alors qu'*ETT* activerait leur croissance. Les résultats obtenus avec le double mutant *arf4-2 ett-13* suggèrent que d'autres facteurs interagissant avec ETT et ARF4 dans la détermination de la taille des sépales et des pétales.

ETT controls carpel morphogenesis by repressing pectin methylesterase inhibitors

Amélie Andres-Robin, Sandrine Paindavoine, Géraldine Brunoud, Frédérique Rozier, Mathieu Reymond, Grégory Mouille, Charlie Scutt and Françoise Monéger

Abstract

In *Arabidopsis*, the gynoecium is formed by two congenitally fused carpels, which differentiate into stigma, style, ovary and gynophore. The transcription factor ETTIN has been shown to participate in the patterning of these different identities, but the corresponding mechanism remained unknown. In order to understand how ETT performs this function, we identified its putative direct targets. Here we find that ETT acts through a surprisingly simple pathway: ETT directly regulates the properties of the cell wall, notably by repressing cell wall remodeling enzymes and in particular PECTIN METHYLESTERASES (PME) and PME INHIBITORS (PMEI). Next we evaluated to what extent ETT activity can be reduced to this cell wall regulation. We found that ETT induces pectin demethylation in the gynoecium valves and that PMEI over-expression mimics the *ett* mutant phenotype. Based on these results, we propose that ETT-based patterning in the gynoecium mainly relies on the modulation of pectin methylesterase activity.

Introduction

The gynoecium is the female reproductive organ specific to flowering plants. After fertilization, it develops into a fruit that contains the seeds and for these reasons, is of major economical importance. The gynoecium is a well-defined structure, which follows a stereotypic growth pattern (Roeder and Yanofsky, 2006). In the model plant *Arabidopsis thaliana*, the gynoecium is formed by two congenitally fused carpels composed of four parts: at the apex, the stigma which receives pollen grains, the style within which the pollen tubes grow, the ovary containing the ovules and the gynophore at the base. The ovary represents the larger part of the gynoecium, whereas the gynophore represents the most reduced part. During development, the establishment of these different domains is tightly controlled by several transcription factors and auxin gradient has been proposed to play a role (Nemhauser et al, 2000). However, how this patterning is achieved is largely unknown.

Loss-of-function *ettin* mutants are typically affected in gynoecium patterning (Session and Zambryski 1995): they exhibit drastic reduction of ovary tissues at the benefit of the gynophore; they also possess a defect in apico-basal polarity since stigmatic papillae normally restricted to the apex of the gynoecium, often expand basally and in addition, ovules normally enclosed in the ovary, often develop at the apex. Interestingly, this phenotype is dramatically enhanced by the *arf4* mutation (Pekker et al, 2005). Both genes ETTIN/ARF3 (ETT) and ARF4 belong to the Auxin Response Factors family (ARF) and encode transcription factors. ARF proteins contains four domains: a DNA binding domain, a domain believed to either activate or repress transcription and two dimerization domains involved in interaction with Aux/IAAs, inhibitors of auxin response. Interestingly, ETT lacks the dimerization domains and is therefore believed to escape auxin regulation. ARFs proteins are known to bind consensus Auxin Response Elements (AuxRE) TGTCTC (Ulmasov et al, 1995). According to their amino acid composition, ARF3 and ARF4 are believed to have a repressive transcriptional activity (Ulmasov et al, 1999; Tiwari et al, 2003).

In order to understand how ETT controls gynoecium development, we identified putative direct targets of ETT. We show that ETT directly represses 13 genes encoding proteins involved in cell wall remodeling. Cell wall composition assessed by Fourier-transform Infrared micro spectroscopy (FT-IR) showed that ETT positively controls the demethylesterification of the pectins in the valves. Interestingly, ectopic expression of PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR (PMEI) gene mimics the phenotype of *ett* mutant. Based on these data, we propose that ETT controls gynoecium morphogenesis by repressing inhibitors of pectin methylesterase activity.

Results

Identification of ETT/ARF3 putative direct targets

To identify the direct target genes of ETT, we generated transgenic plants in which the translocation to the nucleus of constitutively produced ETT-GR fusion protein could be induced by the exogenous application of the hormone analogue dexamethasone (DEX). Inflorescence tissues of transformed plants were treated either with DEX and cycloheximide (CYC) to induce the transcription of ETT-target genes while blocking protein synthesis, or with CYC alone to provide a reference sample. RNA was harvested 2h after induction and processed for expression analyses on CATMA microarrays (Crowe et al, 2003), representing

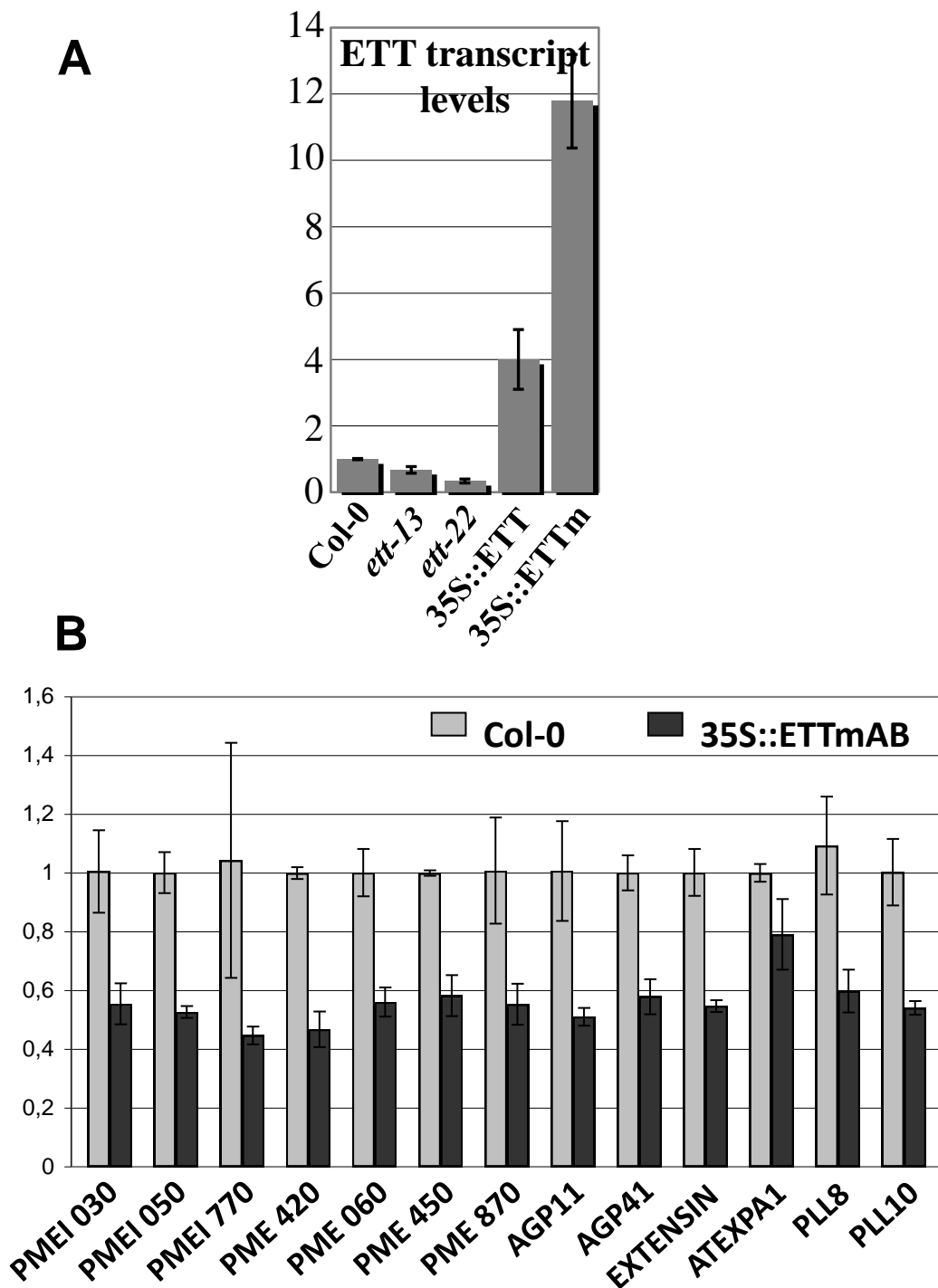


Figure 1: Correlation between ETT expression levels and its targets in inflorescence tissues.

(A) Expression levels of *ETT* were measured by real-time PCR in inflorescence tissues from different lines: Col-0, *ett-13*, *ett-22*, 35S::ETT and 35S::ETTmAB. (B) Expression levels of ETT targets in inflorescences of Col-0 and over-expresser line 35S::ETTmAB. For both A and B, the numbers in ordinate represent the relative amount of transcripts compared to Col-0. Each measure was done using 3 plants and 2 independent experiments were realized. GAPDH was used as a reference gene.

most of the genes in the *A. thaliana* genome. The results of three independent experiments were compared statistically to derive a list of 92 putative ETT-targets (Table S1) among which 22 are activated whereas all the others, representing 76%, are repressed. This observation is consistent with the expected repressive nature of ETT (Ulmasov et al, 1999). Interestingly, among these putative direct targets, 35 (39%) correspond to genes involved in cell wall composition or remodeling. In this study, we focused on 13 genes associated to cell wall remodeling: the pectin methylesterases *PME420* (AT5G07420), *PME060* (AT3G17060), *PME450* (AT2G26450), *PME870* (AT5G27870), the pectin methylesterase inhibitors *PMEI030* (AT5G50030), *PMEI050* (AT2G47050), *PMEI770* (AT1G10770), the expansin *AtEXPA1* (AT1G69530), the *EXTENSIN* (AT1G29140), the arabinogalactan proteins *AGP11* (AT3G01700), *AGP41* (AT5G24105), and the pectate lyase-like enzymes *PLL8* (AT1G14420) and *PLL10* (AT3G01270). We first reasoned that if these genes were indeed repressed by ETT, they should be down-regulated in ETT over-expressing line compared to wild type plants. We therefore performed qPCR experiments to verify this point and first measured the levels of *ETT* transcripts in Col-0, *ett-13*, *ett-22* as well as in lines over-expressing either the wild-type *ETT* cDNA (35S::*ETT*) or a mutated form of *ETT* cDNA insensitive to the degradation by tasiR-ARF (35S::*ETTm*; Hunter et al, 2006). As shown in Figure 1A, ectopic expression of the wild-type *ETT* cDNA leads to an over-expression of 4 times compared to wild-type, whereas ectopic expression of the mutated form leads to an over-expression of almost 12 times. We therefore used the 35S::*ETTm* line to measure the levels of the 13 putative direct targets of ETT involved in cell wall remodeling. As shown in the Figure 1B, all the genes are down-regulated in the over-expressing line in a statistically significant manner, suggesting that ETT indeed represses the expression of these genes. The fact that ETT-GR was able to repress target expression in the presence of cycloheximide, which inhibits translation, suggests that this transcriptional repression is direct.

FT-IR micro-spectroscopy analysis shows that ETT induces pectin demethylation in gynoecium valves

The very high representation (39%) of cell wall regulators among ETT targets strongly suggests a major function of ETT is to modulate the properties of the cell wall. We reasoned that, if this hypothesis is correct, we should be able to identity major defects in *ett* mutant cell wall composition. To test this prediction, we used Fourier-Transform Infrared (FT-IR) micro spectroscopy (Mouille et al, 2003) to analyze qualitatively and quantitatively cell wall composition in mature carpel valves. Siliques from Col-0, *ett-22* mutant and 35S::*ETTm*

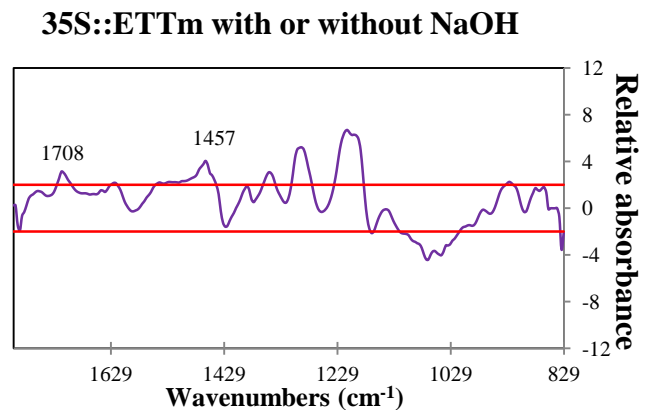
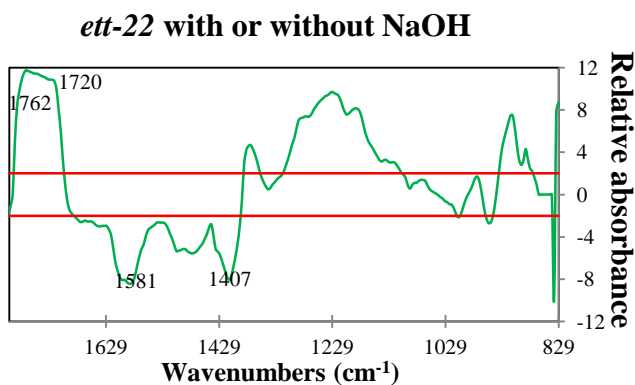
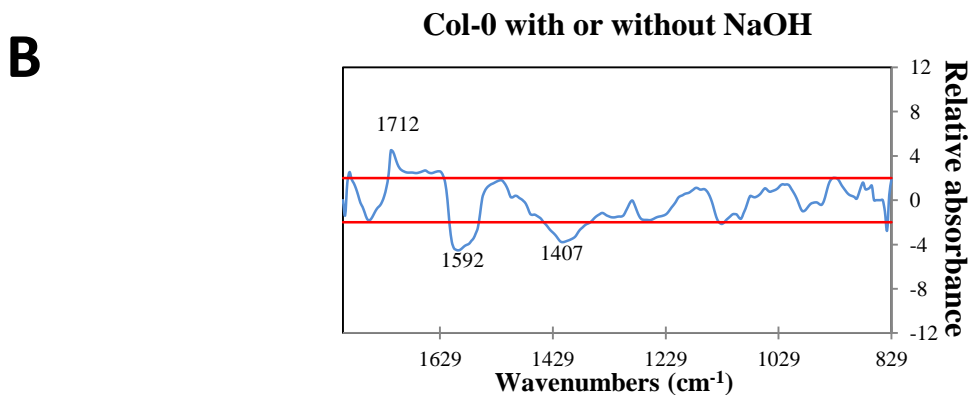
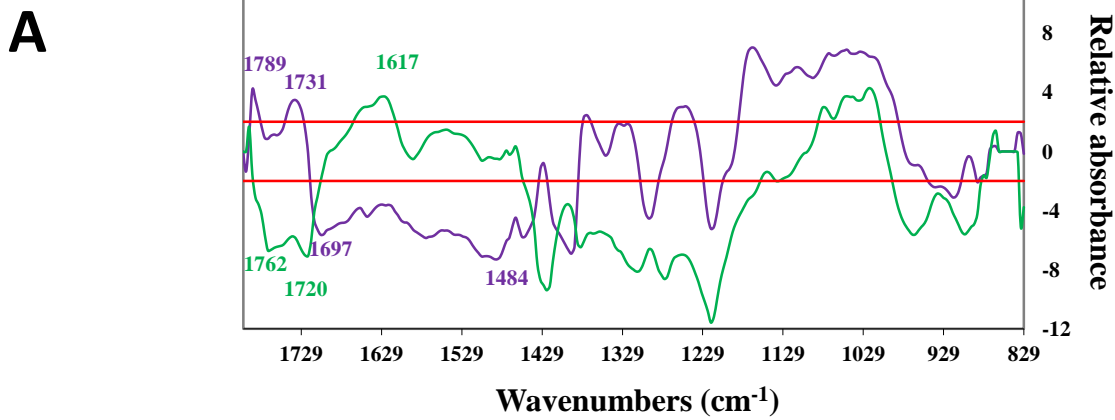


Figure 2: Fourier-transform Infrared (FT-IR) micro spectroscopy on valves reveals a link between ETT and pectin methylesterification.

(A) Student's *t*-test of FT-IR spectra ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) between Col-0 and *ett-22* (green), and between Col-0 and 35S::ETTm (purple) were performed. Several highly significant maxima or minima could be assigned to ester linkage of pectin. Horizontal red lines mark the $p=0.01$ significance levels. (B) Student's *t*-test of FT-IR spectra ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) between before and after NaOH treatment on Col-0, *ett-22* and 35S::ETTm valves were performed. Several highly significant maxima or minima could be assigned to ester linkage of pectin. Horizontal red lines mark the $p=0.01$ significance levels.

plants were collected at stage 17 (as defined by Smyth et al (1990)) and the valves were dissected to be analyzed. Figure 2A shows a Student's T-test on the comparison of the average spectra between carpel valves from Col-0 and two lines, *ett-22* (green curve) and *35S::ETTm* (purple curve), with different levels of expression of *ETT*. In the case of the *ett-22* mutant, we observed a significant increase in the amount of carboxyl ester (peaks at 1762 cm⁻¹ and 1720 cm⁻¹) and a significant decrease in the amount of carboxyl (peak at 1617 cm⁻¹) compared to Col-0 wild type valves. This observation suggests that the valves from *ett-22* mutants contain more methylesterified pectins than the wild type. Inversely, the *ETT* over-expressing lines show a significant decrease in the amount of carboxyl ester (peaks at 1789 cm⁻¹ and 1731 cm⁻¹) and a significant increase in the amount of carboxyl (between 1697 and 1484 cm⁻¹) compared to Col-0 wild type valves. These data thus confirm the major impact of *ETT* on wall composition. They also suggest that the valves from the *ETT* over-expressing lines contain less methylesterified pectins than the wild type. In this scenario, *ETT*'s main function would be to positively control pectin demethylesterification.

In order to confirm these results, we compared the effect of NaOH treatment on the valve tissues. NaOH saponifies methylesterified pectins which thereby become demethylesterified. Figure 2B shows a Student's T-test on the comparison of the average spectra before and after NaOH treatment between valves from the wild type (blue curve), *ett-22* (green curve) and *35S::ETTm* (purple curve) valves. As expected, the NaOH treatment on the wild type valves significantly decreases the amount of carboxyl ester (1712 cm⁻¹) and significantly increases the amount of carboxyl (peaks at 1592 and 1407 cm⁻¹). We observe a similar effect on the *ett-22* mutant, but the difference before and after NaOH treatment is much more pronounced than for the wild type and inversely, the effect is much less pronounced for the *35S::ETTm* plants than for the wild type. These results confirm that *ETT* has a negative effect on the level of pectin methylesterification. In conclusion, our results demonstrate that *ETT* activates the demethylesterification of pectins in the valves.

Since *ETT* activity is negatively correlated with PME activity in the valves, we wondered if the repression of genes encoding PMEI could explain this phenomenon. First of all, we verified by real-time PCR that the genes were expressed in flowers. Expression levels were compared in wild type seedlings, leaves and inflorescence tissues. The results are shown in Figure 3 and show that, except for AtEXPA1, expression is restricted to inflorescences. This is consistent with previous reports, at least concerning the PME genes (Louvet et al, 2006). Therefore, we performed in situ hybridization experiments to verify if the expression

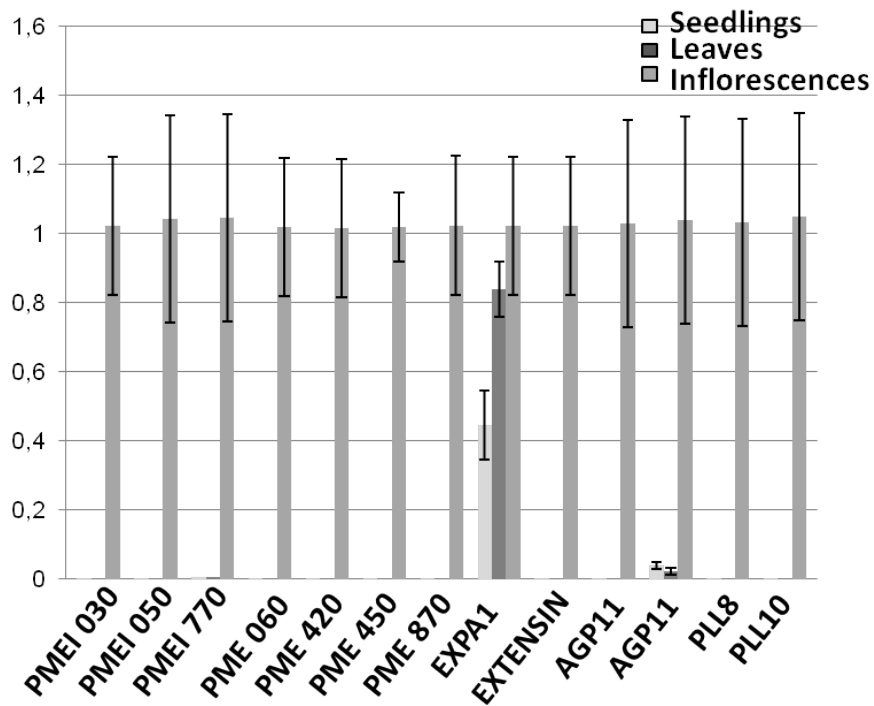


Figure 3: Expression levels of the target genes in different plant tissues measured by real-time PCR.

The level of expression of the 13 target genes were compared among seedlings, leaves and inflorescences. Apart from EXPANSIN1, all the genes show an inflorescence specific expression with almost undetectable levels in other tissues.



Figure 4: Effect of PME and PME1 on carpel morphogenesis.

Carpel phenotypes were compared among wild type Col-0, PME or PME1 over-expressor and *ett-22* mutant. Ectopic expression of PME1 mimics the *ett* mutant phenotype. Two carpels are shown for each genotype except for wild type Col-0.

of at least one of the three PMEI genes was affected by ETT levels in flowers and more specifically in the gynoecium. Unfortunately, the signal was extremely low and diffuse and we could not detect any difference in expression between Col-0, *ett* mutants and over-expresser lines (see Supplemental Data Figure S1).

PME activity is essential for carpel morphogenesis

In order to clarify the role of PME during carpel development, we analyzed the carpel phenotype of plants ectopically expressing either a PME or a PMEI gene (Peaucelle et al, 2008). When PME is ectopically expressed, we observe normal valve development, but the overall shape of the gynoecium is curved and we observe S or U shaped gynoecia instead of straight ones as in the wild type. On the other hand, when PMEI is ectopically expressed, we observe a drastic reduction in valve number and size and in some cases, a total absence of valve (Figure 4). Remarkably, this phenotype is reminiscent of those observed in *ett* mutants. From these results, we conclude that PMEI over-expression mimics *ett* mutations.

Discussion

In this paper, we reveal a putative direct link between ETT, a transcription factor belonging to the auxin response factor family, and cell wall remodeling enzymes. The repression of ETT-targets, following ETT-GR induction, in the presence of an inhibitor of translation (cycloheximide) suggests that this transcriptional control could be direct, and Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments are currently being performed to verify this point. Initially, we used a transgenic line expressing a functional HA-tagged version of ETT under the control of its native promoter, but this material showed no significant enrichment of putative ETT-targets after immunoprecipitation using an anti-HA antibody. We then performed ChIP analyses using the *35S::ETT-GR* line used for the induction experiments, together with an anti-GR antibody, and obtained an approximately twofold enrichment of putative ETT-targets. However, to provide better evidence, we are currently planning to repeat these experiments using a *35S::ETTm-GR* line, in which the transgene is insensitive to tasiR-ARF, which should result in much higher transgene expression levels.

The FT-IR results clearly show that ETT positively controls the demethylesterification of the pectins in the valves. In addition, we show that ectopic expression of PMEI in the valves mimics the phenotype of *ett* mutants. These results suggest that ETT controls gynoecium morphogenesis by repressing inhibitors of pectin methylesterase activity. In an *ett*

mutant, the lack of inhibition of PMEI would lead to an increase in PMEI expression resulting in a decrease in PME activity. A conclusive demonstration of this will require the complementation of the *ett* mutant phenotype by PME ectopic expression. This is expected to compensate for the lack of PMEI inhibition by ETT. Inversely, ectopic expression of PMEI is expected to enhance the *ett* phenotype. These experiments are underway. The transgenic lines ectopically expressing PME5 and PME13 (Peaucelle et al, 2008) have been introgressed in an *ett* mutant background. Plants are actually being genotyped and the phenotype will subsequently be observed.

These results are interesting as they constitute evidence of a putative direct regulation of genes encoding cell wall remodeling enzymes by a transcription factor involved in auxin signaling. Interestingly, auxin has been shown to induce cell wall remodeling genes (Overvoorde et al, 2005). We can therefore suppose that ARF proteins are indeed involved in such a regulation. However, due to the early pattern of expression of ETT, which is expressed in initial and young primordia, we expected other transcriptional intermediates to be involved before the regulation of the final targets that are the genes directly involved in cellular processes such as cell wall remodeling. ETT has already been shown to control the patterning of the gynoecium (Session and Zambryski, 1995). Our results suggest that this patterning is acting via the control of PME activity, which is quite an unexpected result. Interestingly, Peaucelle and coworkers (2011) recently reported that the transcription factor BELLRINGER, modulates phyllotaxis by regulating the expression of a pectin methylesterase in *Arabidopsis*. These results together with the present work provide new insights into the role of pectin demethylesterification in organ formation, and highlight the importance of mechanical parameters in developmental processes.

Material and methods

Plant material, growth conditions and treatment

All transgenic plants were generated in the Columbia (Col-0) ecotype of *Arabidopsis thaliana*. Plants were grown on soil at 20°C in short-day conditions (8 h light/16 h darkness) for 4 weeks before being transferred in long-day conditions (16 h light/8 h darkness). The transgenic lines over expressing PME5 and PME13 were a kind gift from A. Peaucelle (Peaucelle et al, 2008). The plants over expressing the mutated form of ETT insensitive to tasiR-ARF were a kind gift from S. Poethig (Hunter et al, 2006).

Construction of transgenic lines, ETT-induction experiments and microarray analyses.

The *ETT* coding sequence was inserted into *pG0229-35S::GR* (Yu et al, 2004) between the *CaMV-35S* promoter and a sequence encoding the hormone-binding domain of the rat glucocorticoid receptor, so as to conserve the reading frame of the latter element. The resulting plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMP90 cells, which were then used to transform plants of the *A. thaliana* Columbia-0 ecotype by standard methods. A homozygous individual, stably expressing the transgene from a single insertion event, was identified from the ensuing T2 generation and two populations, each composed of ten T3 descendants of the selected T2 plant, were grown to maturity and pre-treated by dipping their inflorescences for 2 min in solutions containing cycloheximide (CYC; 10 µg/ml) and Silwet L-77 surfactant (0.01% v/v). *In vivo* labeling experiments using [³⁵S]-methionine (details available on request) had previously demonstrated this treatment to reduce translation to ~5% of its native level. One hour later, inflorescence tissues of the two populations were dipped for a further 2 min in solutions containing CYC and Silwet L-77 as above, with or without dexamethasone (DEX; 10 µM) to induce the nuclear translocation of ETT-GR. These solutions also contained 0.1% (v/v) ethanol, as DEX was diluted from stock solutions (1000x) in ethanol. After a further period of 2h, treated inflorescence tissues, excluding open flower buds, were harvested and RNA was extracted from these using Trisol Reagent (Sigma) for use in microarray analyses (Lurin et al, 2004). This procedure was replicated three times independently using separate progeny from the same original T2 transformant. The statistical analysis of microarray data was performed using published methods (Gagnot et al, 2008).

RNA extraction and real time RT-PCR analyses

Total RNA was extracted from inflorescences using Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma). RNA was then treated with DNase (Turbo DNA-free from Ambion) to eliminate DNA contamination and four micrograms was subsequently reverse transcribed using RevertAid Reverse Transcriptase enzyme (Fermentas). The 20 µl of RT reaction were diluted to 1 ml and 5 µl of this diluted cDNA was subjected to qPCR using SYBR GREEN (Roche) in a StepOne Plus machine (Applied). Efficiency of each primer pair was determined by standard curves using serial cDNA dilutions. PCR was performed using a 3-step protocol with a melting curve. Results were normalized to the expression of GAPDH gene (At3g26650) and analyzed by $2\Delta\Delta C_t$ method. Each value was the mean result of a minimum of 3 plants and each experiment was repeated twice independently. Student test (F test) was realized for each

batch of sample with a p-value < 0.05. The sequences of the primers used are given in the Supplemental Data Table S2.

FTIR

FT-IR was performed following the method described in Mouille et al, 2003.

In situ hybridization

The protocol used for in situ hybridization experiments was as described by Ferrandiz and Sessions (2002). Full length cDNAs were used as gene specific probes and GFP coding sequence was used as negative control.

Supplemental data

Table S1: List of genes the expression of which is significantly changing upon ETT-GR induction.

Table S2: List of primer pairs used for real-time PCR analyses.

Figure S1: In situ hybridization on inflorescence tissues using *PME420*, *PME060*, *PME450*, *PME870*, *PMEI030*, *PMEI050* and *PMEI770* as probes.

References

- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S., Rouze, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W., and Trick, M. (2003). CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res* **31**, 156-158.
- Ferrandiz, C., and Sessions, A. (2002). Nonradioactive in situ hybridization. In *Arabidopsis: a laboratory manual*, D.a.G. Weigel, J., ed (Cold spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory press), pp. 195-203.
- Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A., and Brunaud, V. (2008). CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* **36**, D986-990.
- Hunter, C., Willmann, M.R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M., and Poethig, S.R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* **133**, 2973-2981.
- Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guenin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F., and Pelloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in Arabidopsis thaliana. *Planta* **224**, 782-791.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L., and Small, I. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103.

- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., and Hofte, H.** (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J* **35**, 393-404.
- Nemhauser, J.L., Feldman, L.J., and Zambryski, P.C.** (2000). Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877-3888.
- Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A.** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **17**, 3282-3300.
- Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J.N., Hofte, H., Laufs, P., Pelloux, J., and Mouille, G.** (2008). Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr Biol* **18**, 1943-1948.
- Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J.N., Salsac, F., Morin, H., Fournet, F., Belcram, K., Gillet, F., Höfte, H., Laufs, P., Mouille, G. and Pelloux, J.** (2011). Transcription factor BELLRINGER modulates phyllotaxis by regulating the expression of a pectin methylesterase in Arabidopsis. *Development* (in press).
- Pekker, I., Alvarez, J.P., and Eshed, Y.** (2005). Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-2910.
- Roeder, A.H.K., and Yanofsky, M.F.** (2006). Fruit development in Arabidopsis. The arabidopsis book **February**, 1-50.
- Sessions, R.A., and Zambryski, P.C.** (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild and in ettin mutants. *Development* **121**, 1519-1532.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.** (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**, 533-543.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**, 1611-1623.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5844-5849.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet* **36**, 157-161.

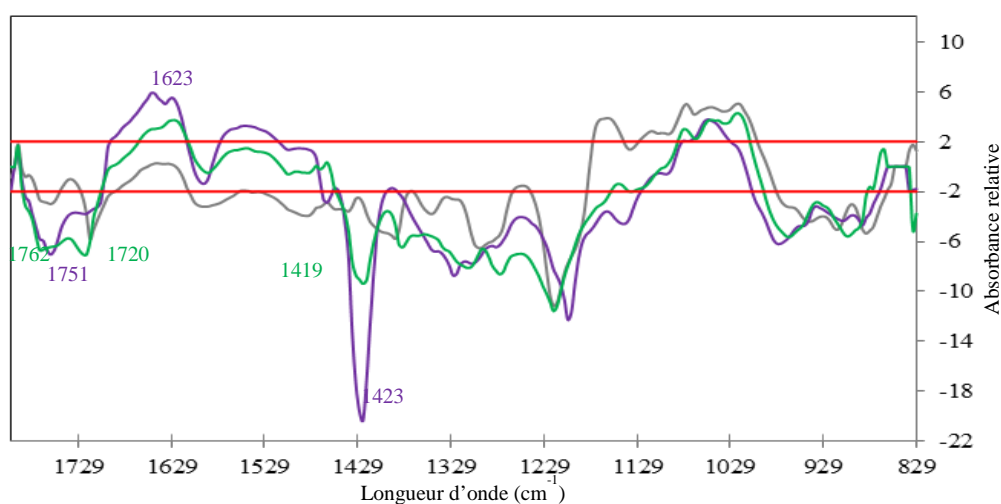
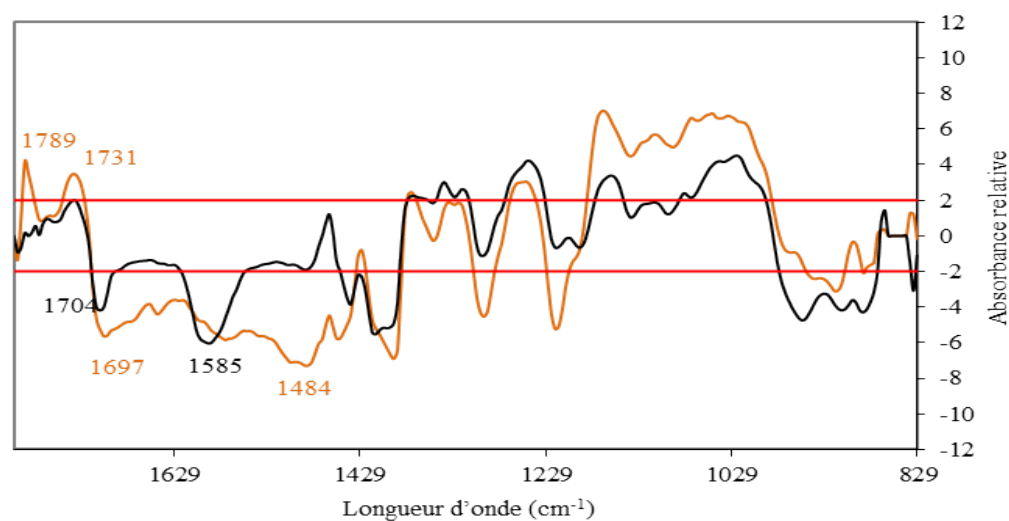
A**B**

Figure I-14 : ETT active la déméthylestérification des pectines.

Résultats des tests de Student sur les spectres ($800-1800\text{ cm}^{-1}$) obtenus par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sur des valves de gynécées au stade 17 entre (A) des plantes sauvages et des plantes mutantes *ett-13* (vert clair), *arf4-2* (gris) et *arf4-2 ett-13* (violet) et entre (B) des plantes sauvages et des plantes sur-exprimant *ETT* et/ou *ARF4* : 35S::ETTm (orange) et *rdr6-15* (noir). Les lignes horizontales rouges marquent la p-value égale à 0,01.

C- ETT et le remodelage de la paroi (suite)

1- Le patron d'expression des gènes cibles directes putatifs impliqués dans le remodelage de la paroi

Nous avons regardé si le patron d'expression des gènes cibles dans le gynécée est modifié lorsque le niveau d'expression d'*ETT* varie. Pour cela, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des inflorescences de plantes sauvages, mutantes *arf4 ett* et *p35S::ETTm*. Les résultats sont présentés en annexe 2 et ne montrent, excepté pour *AGP11*, globalement aucun signal spécifique dans aucune des lignées analysées. Le signal obtenu avec la sonde *AGP11* apparaît fortement sur l'ensemble du gynécée, cependant aucune différence de niveau d'intensité ou de patron d'expression n'est détectée entre les différentes lignées. Cette approche ne nous a donc pas permis de vérifier l'impact du niveau d'ETT sur l'expression de ces gènes cibles au cours du développement floral.

2- Composition de la paroi chez les mutants dont le niveau d'ETT est modifié

Dans le but de comprendre l'impact d'ETT et d'ARF4 sur la composition de la paroi dans les valves de carpelle, j'ai complété les analyses de FT-IR présentées dans l'article. Ces résultats révèlent chez le mutant *ett-13* (vert) une augmentation significative de la quantité de liaisons ester (pics 1762 cm^{-1} et 1720 cm^{-1}) et une diminution significative de la quantité de groupements carboxyle (pic 1617 cm^{-1}). Ceci suggère que chez le mutant *ett-13*, les parois des valves possèdent des pectines plus méthylestérifiées que chez le sauvage. J'ai également analysé des carpelles (au stade 17) chez des mutants *ett-13*, *arf4-2*, *arf4-2 ett-13*, *rdr6-15* et *35S::ETTm*. Les résultats sont présentés sur la Figure I-14. Chez le mutant *arf4-2* (gris), on constate une augmentation faible mais significative de la quantité de liaisons ester (pic 1720 cm^{-1}) mais pas de diminution significative de la quantité de groupements carboxyle. L'augmentation de la quantité de liaisons ester est plus faible chez le mutant *arf4-2* que chez le mutant *ett-13*. Chez le double mutant *arf4-2 ett-13* (violet), on constate également une augmentation significative de la quantité de liaisons ester (pic 1751 cm^{-1}) et une diminution significative de la quantité de groupements carboxyle (pic 1623 cm^{-1}). L'augmentation de la quantité de liaisons ester ne semble pas différente entre *ett-13* et *arf4-2 ett-13* mais la diminution de la quantité de groupements carboxyle est plus importante chez le double mutant que chez le simple mutant *ett-13*. La Figure I-14B montre le résultat du test de Student

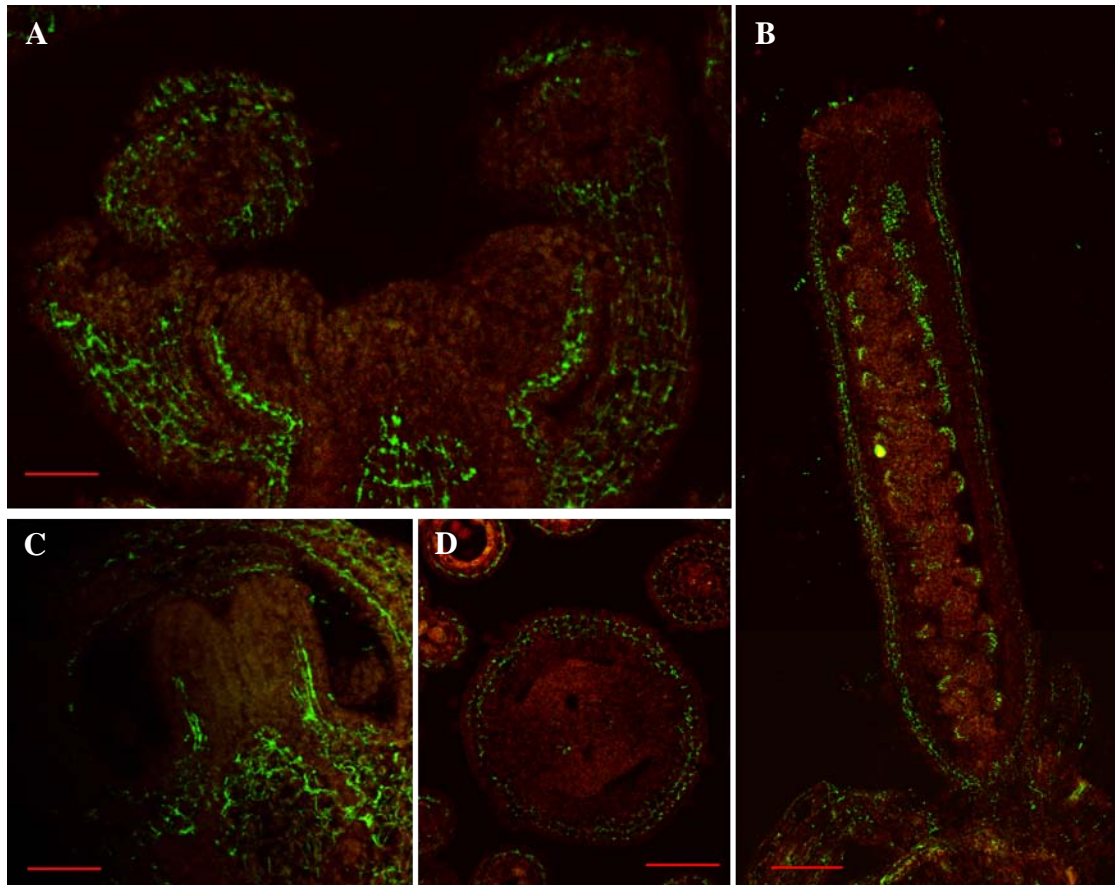


Figure I-15 : Détection *in situ* des pectines déméthylestérifiées sur des coupes d'inflorescences sauvages.

Immunolocalisation des pectines déméthylestérifiées avec l'anticorps 2F4 sur des coupes longitudinales d'inflorescences sauvages Col-0. Coupes longitudinales de (A) méristème d'inflorescence, (C) gynécée au stade 7 et (B) gynécée au stade 12, et (D) coupe transversale de gynécée au stade 10. Les barres d'échelle représentent 50µm (A, C, D) et 100µm (B).

comparant la moyenne des spectres entre Col-0 et deux lignées : p35S::ETTm (jaune) et *rdr6-15* (noir), la première sur-exprimant uniquement *ETT* et la deuxième surexprimant à la fois *ETT* et *ARF4*. Nous avons vu précédemment que la lignée surexpresseur montre au niveau des valves, une diminution significative de la quantité de groupements ester carboxyliques (pics à 1789 cm^{-1} et 1731 cm^{-1}) et une augmentation significative de la quantité de groupements carboxyle (entre 1697 et 1484 cm^{-1}) comparé aux valves de carpelles sauvages. Les mutants *rdr6-15* présentent une augmentation significative de la quantité de groupements carboxyle (pics 1704 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} et 1407 cm^{-1}) mais la quantité de liaisons ester n'est pas significativement différente comparé aux valves de carpelles sauvages.

Ces résultats complémentaires montrent donc que la quantité de liaisons ester n'est pas différente entre le simple mutant *ett-13* et le double mutant *arf4-2 ett13*, le double mutant ne semble pas aggravé le défaut de méthylation des pectines. De plus, la quantité de groupements carboxyle est plus faible chez le mutant *rdr6-15* que chez la lignée p35S::ETTm. **Ces données suggèrent que seul le gène *ETT* favorise significativement la déméthylestérification des pectines.**

La restauration du phénotype d'*ett* par la surexpression de PME sera nécessaire pour prouver que le niveau de méthylation des pectines est responsable du phénotype carpellaire du mutant *ett*. Dans le cas où la surexpression d'une *PME* sous le contrôle d'un promoteur fort ne restaure pas le phénotype d'*ett*, on pourra supposer qu'un patron d'expression précis est nécessaire à la correcte mise en place des valves c'est pourquoi nous proposons d'exprimer une *PME* sous le contrôle du promoteur d'*ETT* en ajoutant les régions de reconnaissance au tasiR-ARF afin d'être fidèle au patron d'expression d'*ETT*.

3- *ETT* et la déméthylestérification des pectines

Dans le but de localiser *in situ* l'effet d'*ETT* sur la déméthylestérification des pectines, j'ai déterminé la localisation des pectines fortement déméthylestérifiées dans un gynécée sauvage et mutant *ett* par immunolocalisation. J'ai tout d'abord utilisé l'anticorps 2F4, spécifique des pectines déméthylestérifiées, sur des inflorescences sauvages (Liners et al., 1989). Les résultats présentés sur la figure I-15 montrent la présence de pectines fortement déméthylestérifiées au niveau des tissus vasculaires des primordia de fleur. Au stade 7, le gynécée présente des pectines fortement déméthylestérifiées dans la zone abaxiale. Cependant, les deux couches cellulaires externes de la zone abaxiale du gynécée ne présentent

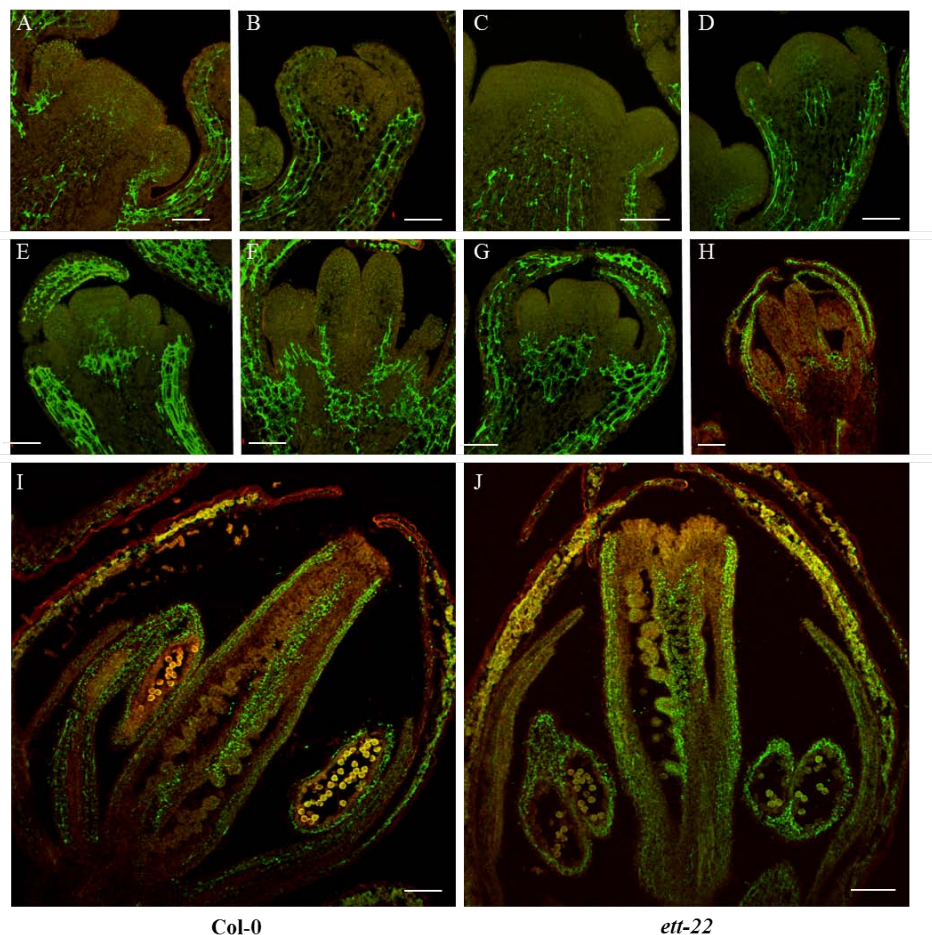


Figure I-16 : Détection *in situ* des pectines déméthylestérifiées sur des coupes d'inflorescences sauvages et mutantes *ett-22*.

Immunolocalisation des pectines déméthylestérifiées avec l'anticorps JIM5 sur des coupes longitudinales d'inflorescences sauvages Col-0 (A-B, E-F, I) et mutantes *ett-22* (C-D, G-H, J). Coupes longitudinales de (A, C) méristèmes d'inflorescences, (B, D) fleurs au stade 3, (E, G) fleurs au stade 6, (F, H) fleurs au stade 7 et (I-J) gynécées au stade 12. Les barres d'échelle représentent 50µm (A-H) et 100µm (I-J).

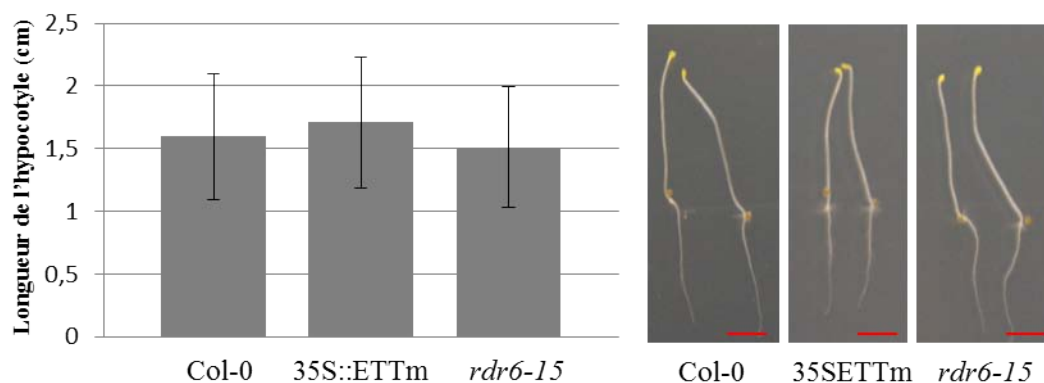


Figure I-17 : ETT ne modifie pas l'élongation cellulaire dans l'hypocotyle.

Des hypocotyles étiolés de plantes Col-0, 35S::ETTm et *rdr6-15* ont été cultivés à l'obscurité. Après 10 jours, leurs longueurs ont été mesurées et sont représentées. Deux plantules de chaque génotype sont montrées à droite. Les barres d'échelle représentent 5mm.

pas de signal. A ce stade, le signal est également absent de l'apex du gynécée. On remarque également sur la coupe transversale du gynécée au stade 8/9 que le signal est présent dans la zone abaxiale excepté sur la ou les couches cellulaires externes. Au stade 12, on observe toujours le signal dans la zone abaxiale du gynécée et on remarque un marquage au niveau des ovules. On constate que le patron d'expression d'*ETT* présenté sur la figure I-5 et le signal en immunolocalisation des pectines fortement déméthylestérifiées se chevauchent au niveau du gynécée et des tissus vasculaires. Ces données renforcent l'idée selon laquelle *ETT* serait impliqué dans la déméthylestérification des pectines. L'anticorps présentant des problèmes de reproductibilité, nous avons choisi d'utiliser un autre anticorps pour faire l'analyse comparative entre le sauvage et le mutant *ett*. Nous avons donc cette fois utilisé l'anticorps JIM5, spécifique des pectines fortement déméthylestérifiées, sur des inflorescences sauvages et mutantes *ett*. Les résultats obtenus sur des inflorescences sauvages sont similaires à ceux obtenus avec l'anticorps 2F4. La figure I-16 montre que le signal JIM5 est identique sur les inflorescences sauvages et mutantes *ett*. Ces données ne montrent donc pas de différence significative entre les plantes sauvages et mutantes. L'immunolocalisation n'étant pas quantitative, on ne considère cependant pas que ces résultats soient en contradiction avec ceux obtenus par l'analyse en FT-IR.

4- *ETT* et la croissance

Puisqu'il semble qu'*ETT* modifie le degré de méthylation des pectines, au moins dans les valves, il est sans doute impliqué dans le remodelage de la paroi cellulaire. Nos résultats suggèrent qu'*ETT* activerait la déméthylestérification des pectines, ce qui pourrait soit permettre la création de boîtes à œuf en présence de calcium et ainsi rigidifier la paroi, soit permettre l'activation d'enzymes telles que des pectates lyases (PL) en libérant des protons et ainsi assouplir la paroi. Dans un sens comme dans l'autre, on peut imaginer qu'*ETT* pourrait influencer l'elongation cellulaire. Afin de déterminer si *ETT* engendre une modification de la croissance, nous avons dans un premier temps mesuré la longueur des hypocotyles étiolés de plantules sauvages Col-0, p35S::*ETT*m et *rdr6-15*. En effet, le mécanisme d'étiollement implique majoritairement une elongation cellulaire. Les graines ont été semées sur un milieu nutritif et placées à l'obscurité. Après 10 jours, la longueur des hypocotyles a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure I-17 et montrent qu'il n'y a pas de différence significative de la longueur des hypocotyles entre les plantes sauvages Col-0, p35S::*ETT*m et *rdr6-15*. Par contre, la mesure de la taille des pièces florales au stade 12 que

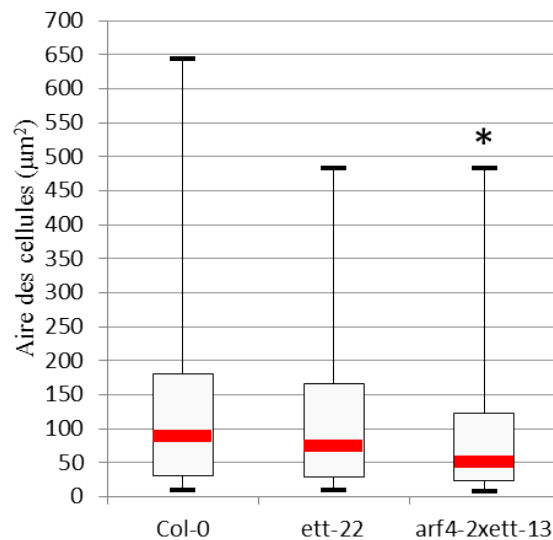


Figure I-18 : ETT et ARF4 active la croissance cellulaire au niveau des valves.

Boîte à moustache représentant la distribution de l'aire des cellules d'épiderme de valves sauvages Col-0 et mutantes *ett-22* et *arf4-2 ett-13*. Les traits rouges représentent la médiane, les traits noirs aux extrémités représentent les valeurs maximales et minimales et les rectangles débutent aux premiers quartiles et finissent aux troisièmes quartiles. L'astérisque indique une p-value inférieure à 0,05.

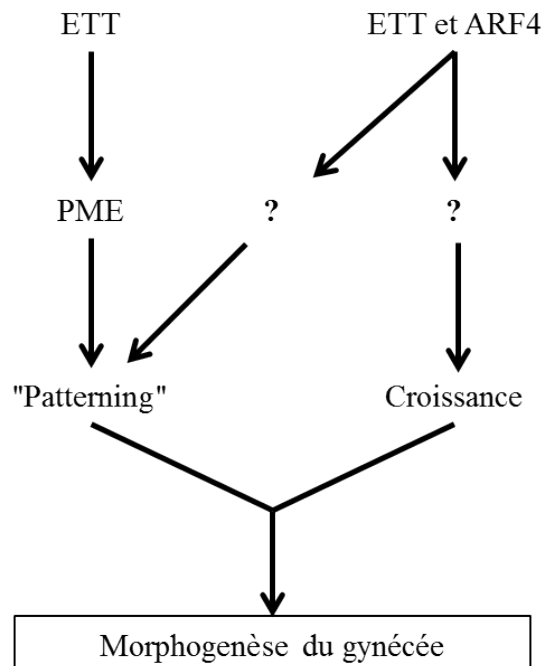


Figure I-19 : Modèle du rôle d'ETT et d'ARF4 dans la morphogenèse du gynécée.

nous avons détaillée précédemment, montre qu'ETT activerait la croissance des sépales, des pétales, du gynécée et des valves. Le rôle d'ETT dans la croissance du gynécée et des valves serait partiellement redondant avec ARF4. En conclusion, on constate un effet d'ETT et d'ARF4 sur la croissance mais pas dans l'hypocotyle, il se peut qu'ETT ne soit pas exprimé dans les lignées p35S ::ETTm et *rdr6-15*.

Toujours dans l'idée d'un effet sur le remodelage de la paroi, nous avons voulu savoir si ETT pouvait contrôler la taille des cellules. Nous avons comparé l'aire des cellules de valves entre des plantes sauvages Col-0 et mutantes *ett-13* et *arf4-2 ett13*. Pour cela, nous avons réalisé des images de gynécées en microscopie électronique à balayage (MEB) et avons mesuré l'aire des cellules de l'épiderme des valves à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont présentés sur la figure I-18 et montrent qu'il n'y a pas de différence significative de la taille des cellules entre des plantes sauvages et mutantes *ett-13*. Cependant chez le double mutant *arf4-2 ett-13* les cellules des valves sont significativement plus petites que les cellules des valves d'une plante sauvage. **Ceci suggère qu'ETT et ARF4 agirait de façon redondante pour contrôler positivement la taille des cellules au niveau de la couche épidermique des valves.**

En conclusion, la composition de la paroi cellulaire des valves sauvages et mutantes *arf4-2*, *ett-13* et *arf4-2 ett-13*, déterminé par FTIR, montre une différence de méthylation des pectines entre le mutant *ett-13* et le sauvage mais cette différence n'est pas aggravée par la mutation d'*ARF4*. Ceci suggère que seul *ETT* participerait à la déméthylation des pectines. D'autre part, on a constaté qu'ETT et ARF4 sont redondants par rapport à l'activation de la croissance cellulaire, montrant que **la croissance cellulaire est indépendante du degré de méthylation des pectines.**

Des travaux ont montré un rôle d'ETT dans le "patterning" du gynécée et ce processus n'implique pas, a priori, de régulation de la croissance (Sessions, 1997). Par contre, une fois les valves établies, la croissance est nécessaire à leur expansion et nos résultats suggèrent que ce processus serait contrôlé, au moins en partie, par ETT et ARF4. Nous avons également constaté chez le double mutant *arf4-2 ett-13* une diminution du nombre de valves, ce qui suggère qu'ARF4 aurait également un rôle dans le "patterning" du gynécée (Figure I-19). Etant donné qu'ARF4 ne semble pas modifier le degré de méthylation des pectines, on peut supposer qu'il pourrait contrôler l'expression d'autres acteurs du remodelage de la paroi.

Bien que nous ayons montré qu'ETT et ARF4 activent la croissance, nous avons également constaté qu'ETT réprime plusieurs gènes activant possiblement l'élongation cellulaire tels que l'expansine, les AGP ou les pectates lyase. En effet, pour certains membres de ces familles, il existe des évidences montrant un rôle dans l'élongation cellulaire et la croissance. Ces résultats peuvent sembler contradictoires avec un rôle positif d'ETT dans la croissance. Une explication possible pourrait être que cette régulation ait lieu dans d'autres parties de la plante.

D- ETT et la signalisation de l'auxine

Les résultats des puces à ADN montrent que l'expression d'*IAA6* et d'*IAA17* seraient réprimée par ETT et que l'expression de *BT2* serait au contraire activée. *IAA6* et *IAA17* appartiennent à la famille des Aux/IAA qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction, inhibent l'activité transcriptionnelle des ARF par dimérisation et sont dégradés en présence d'auxine. Les pertes de fonction d'*IAA6* et *IAA17* n'induisent pas de phénotype (Overvoorde et al., 2005). Cependant une mutation dans le domaine DII du gène *IAA17* induisant une stabilisation de la protéine malgré la présence d'auxine, provoque un phénotype caractéristique d'un niveau d'auxine faible. Ce mutant appelé *auxin resistant 3* (*axr3*) présente un phénotype nain, des racines agravitropiques, une absence de poils racinaires, une augmentation de la dominance apicale et une courbure des feuilles de rosette (Leyser et al., 1996; Perez-Perez et al., 2010; Tanimoto et al., 2007). Le gène *IAA6* est fortement activé alors qu'*IAA17* est faiblement activé par l'auxine. L'activation d'*IAA17* par l'auxine n'est pas modifiée lorsque le gène *IAA6* est muté par contre l'activation d'*IAA6* par l'auxine est augmentée chez le mutant perte de fonction *iaa17* et est abolie chez le mutant gain de fonction *axr3* (Overvoorde et al., 2005). Ces données suggèrent que l'activation d'*IAA6* par l'auxine est dépendante d'*IAA17* alors que l'activation d'*IAA17* par l'auxine est indépendante d'*IAA6*.

47

Des études ont montrées que *BT2* est rapidement activé par l'auxine (Robert et al., 2008). Le mutant *bt2-1* est capable de restaurer le phénotype du mutant *yuc1*, mutant sur-exprimant le gène *YUCCA1* (Mandadi et al., 2009). Hélène Robert a montré au cours de sa thèse l'interaction protéique entre PINOID (PID) et BT2 par gel retard. En fonction du niveau d'expression de *PID*, la protéine PIN1 présente une localisation membranaire basale ou apicale, ce qui engendre une modification de la direction du flux d'auxine (Friml et al., 2004). De plus, la protéine BT2 a été localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme de protoplastes d'*Arabidopsis* exprimant la protéine BT2 fusionnée à la protéine fluorescente jaune (YFP) (Robert et al., 2008). Ces données suggèrent que *BT2* est impliqué dans la voie de signalisation de l'auxine. On peut supposer que BT2 agirait en association avec PID dans la localisation des pompes PIN.

Nous avons dans un premier temps vérifié l'implication d'ETT dans la régulation transcriptionnelle de ces trois gènes, puis nous avons cherché à comprendre si cette régulation était importante dans la morphogenèse du carpelle.

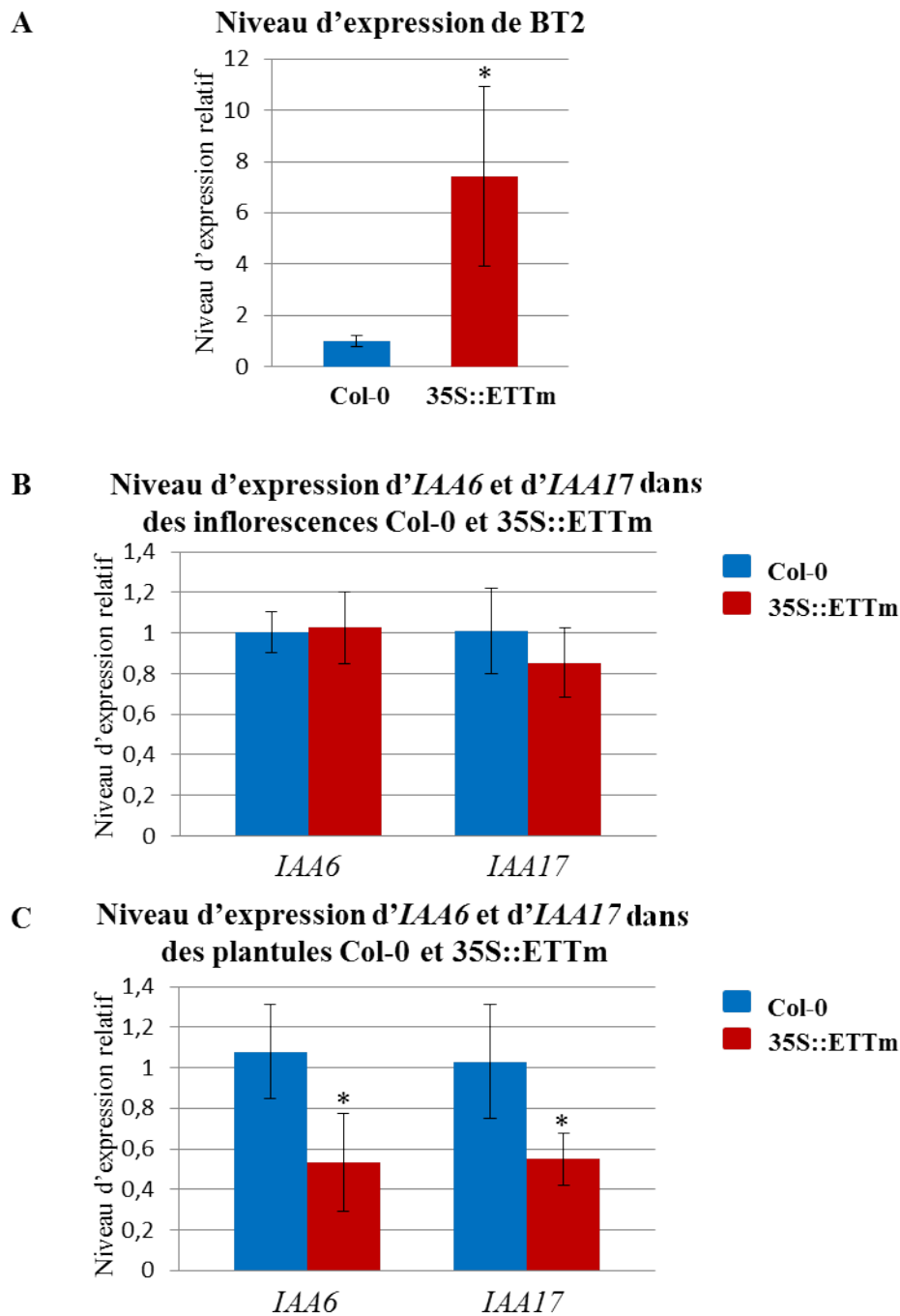


Figure I-20 : ETT active *BT2* et inhibe *IAA6* et *IAA17*.

Résultats de RT-PCR quantitatives montrant les niveaux d'expression relatifs (normalisés par rapport à l'expression du gène *GAPDH*) (A) de *BT2*, (B-C) d'*IAA6* et d'*IAA17* sur (A-B) des inflorescences et (C) des plantules sauvages (bleu) et 35S::ETTm (rouge). * : p-value<0,05.

1- ETT active *BT2* et inhibe *IAA6* et *IAA17*

Pour vérifier l'activation de *BT2* et l'inhibition d'*IAA6* et d'*IAA17* par ETT, nous avons mesuré leurs niveaux d'expression relatifs par RT-PCR quantitative sur des inflorescences sauvages et des inflorescences sur-exprimant *ETT*. Les résultats présentés sur la figure I-20 montrent que l'expression relative de *BT2* est significativement plus importante chez la plante sur-exprimant *ETT* que chez une plante sauvage. En effet, le niveau d'expression de *BT2* apparaît environ sept fois plus important chez la lignée p35S::ETTm comparé à la lignée sauvage. En revanche, les niveaux d'expression relatifs d'*IAA6* et d'*IAA17* sur des inflorescences sauvages ne sont pas significativement différentes des niveaux d'expression mesurés sur des plantes sur-exprimants *ETT*. Cependant, si l'on effectue les mesures à partir de plantules, les niveaux d'expression relatifs d'*IAA6* et d'*IAA17* montrent une différence significative. En effet, on observe une diminution significative des niveaux d'expression relatifs d'*IAA6* et d'*IAA17* d'environ 50% chez les plantules p35S::ETTm comparé aux plantules sauvages. **Ces données associées aux résultats des puces suggèrent qu'ETT activerait directement la transcription du gène *BT2* et inhiberait directement l'expression d'*IAA6* et d'*IAA17*.**

Comme ETT inhibe l'expression d'*IAA6* et d'*IAA17*, nous pouvons supposer que le triple mutant *iaa6 iaa17 ett* pourrait restaurer au moins en partie, le phénotype du mutant *ett*. Pour cela, nous avons effectué des croisements entre le mutant *iaa6-1* et *iaa17-6* et avons obtenu des plantes doubles mutantes *iaa6-1 iaa17-6*. Ces plantes ne présentent pas de phénotype et les croisements avec *ett-22* sont en cours.

Nous avons vu dans l'introduction de ce chapitre que le mutant *bt2-1* restaure partiellement le phénotype du mutant *yuc1D*. Le mutant *yuc1D*, sur-exprimant le gène *YUCCA1*, possède un phénotype associé à une surproduction d'IAA. Ainsi *BT2* serait impliqué dans l'activation de la réponse à l'auxine. Les données des puces à ADN renforcent l'hypothèse selon laquelle le gène *ETT* serait un ARF répresseur, on peut donc supposer que lorsqu'il est muté, le niveau de réponse à l'auxine est augmenté, comme chez le mutant *yu1D*. Nous pouvons donc supposer que le mutant *bt2-1* pourrait restaurer partiellement le phénotype du mutant *ett*. Cependant nous venons de voir qu'ETT inhibe *IAA6* et *IAA17*. La surexpression d'*IAA6* et d'*IAA17* chez un mutant *ett* devrait inhiber la réponse à l'auxine. De plus, ETT active *BT2*, donc chez un mutant *ett* le niveau d'expression de *BT2* devrait être plus faible. Nous avons deux hypothèses probable c'est pourquoi, nous avons croisé le mutant *ett-22* avec le mutant *bt2-1* mais également avec une lignée surexprimant *BT2* : *BT2OE*

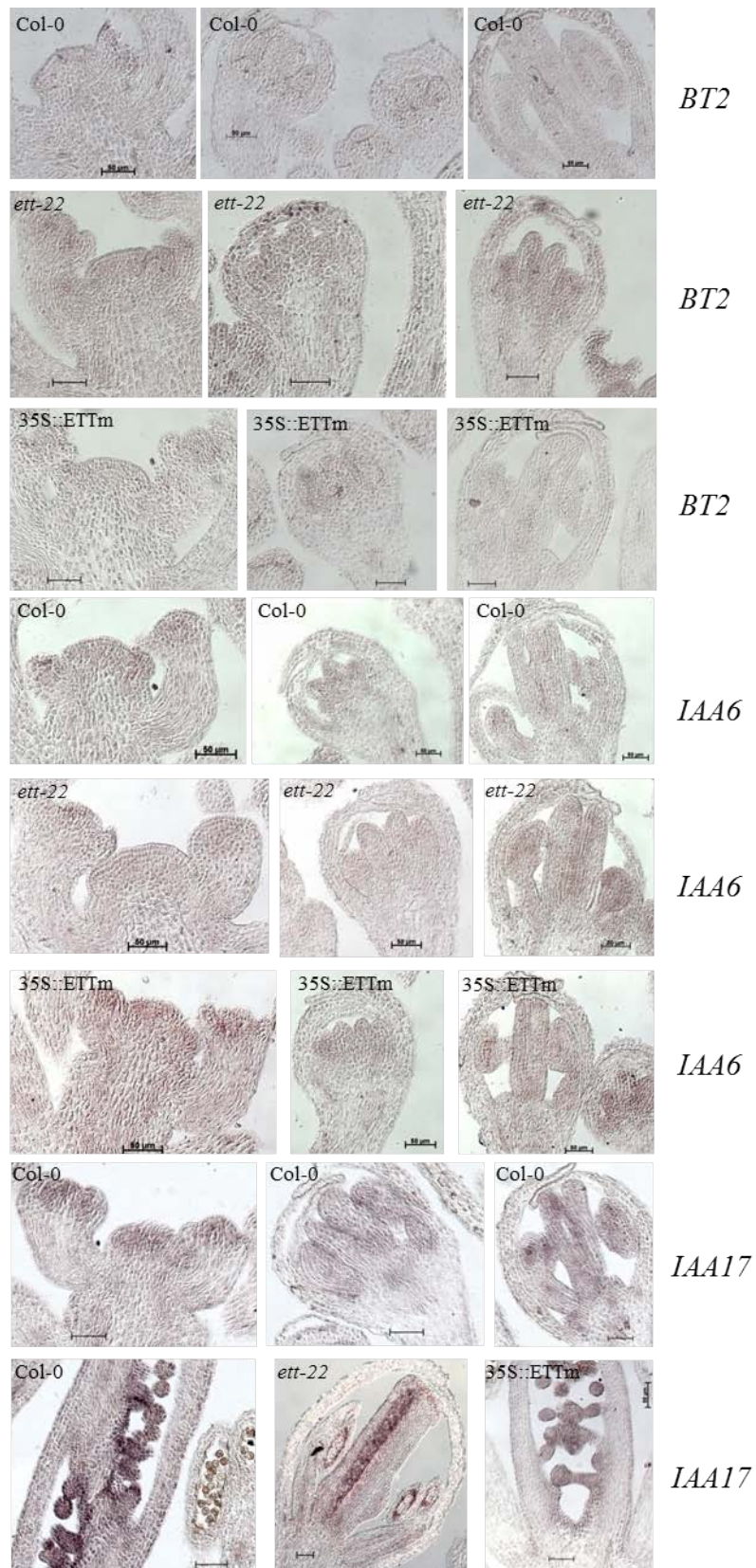


Figure I-21 : Patrons d'expression de *BT2*, d'*IAA6* et d'*IAA17* dans les inflorescences de plantes sauvages Col-0, *ett-22* et 35S::ETTm.

Hybridations *in situ* avec les sondes *BT2*, *IAA6* et *IAA17* sur des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes sauvages Col-0, mutantes *ett-22* et transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.

caractérisé par Mandadi et ses collaborateurs (Mandadi et al., 2009). Ces auteurs ont montré également que le niveau d'expression de *BT2* était modulé par l'horloge circadienne de la plante. Durant la nuit le niveau d'expression de *BT2* est fortement augmenté comparé au niveau d'expression quantifié au cours de la journée. Or l'horloge circadienne régule de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, la croissance et le développement de la plante (McClung, 2006). Il serait intéressant de voir si le niveau d'expression d'*ETT* est lui aussi, modulé par l'horloge circadienne.

2- Les patrons d'expression de *BT2*, d'*IAA6* et d'*IAA17* dans le gynécée

Afin de mettre en évidence une éventuelle modification du patron d'expression de *BT2*, *IAA6* et *IAA17* en fonction du niveau d'expression d'*ETT*, nous avons réalisé des hybridations *in situ* avec les sondes de *BT2*, *IAA6* et *IAA17* sur des inflorescences présentant différents niveaux d'expression d'*ETT* : une plante sauvage, une plante mutante *ett-22* et la lignée p35S::*ETTm*. La figure I-21 montre les résultats de l'hybridation *in situ* avec la sonde *BT2* et *IAA6*. On n'observe aucun signal dans le gynécée des différentes lignées, ni avec la sonde *BT2* ni avec la sonde *IAA6*. Ces données suggèrent que soit ces gènes ne sont pas exprimés dans l'inflorescence, soit leur expression est trop faible pour être détectée par hybridation *in situ*. La figure I-21 montre les résultats de l'hybridation *in situ* avec la sonde *IAA17* sur des inflorescences *col-0*, *ett-22* et p35S::*ETTm*. On constate qu'*IAA17* est uniquement exprimé dans les ovules et que l'intensité du signal obtenu en hybridation *in situ* n'est pas modifiée dans les différentes lignées.

Ces gènes ne semble pas impliqué dans le développement du gynécée, ils sont probablement importants à d'autres stades de développement de la plante.

3- *ETT* et la réponse à l'auxine

Nous venons de voir qu'*ETT* inhibe *IAA6* et *IAA17* dans des plantules. Chez un mutant *ett*, la surexpression d'*IAA6* et d'*IAA17* devrait inhiber la réponse à l'auxine dans les plantules.

Nous avons donc décidé de regarder si le patron d'expression de DR5 serait modifié dans des feuilles ou des racines de plante mutante *ett*. Pour cela, nous avons observé en microscopie confocale l'émission de fluorescence produite après excitation de la protéine

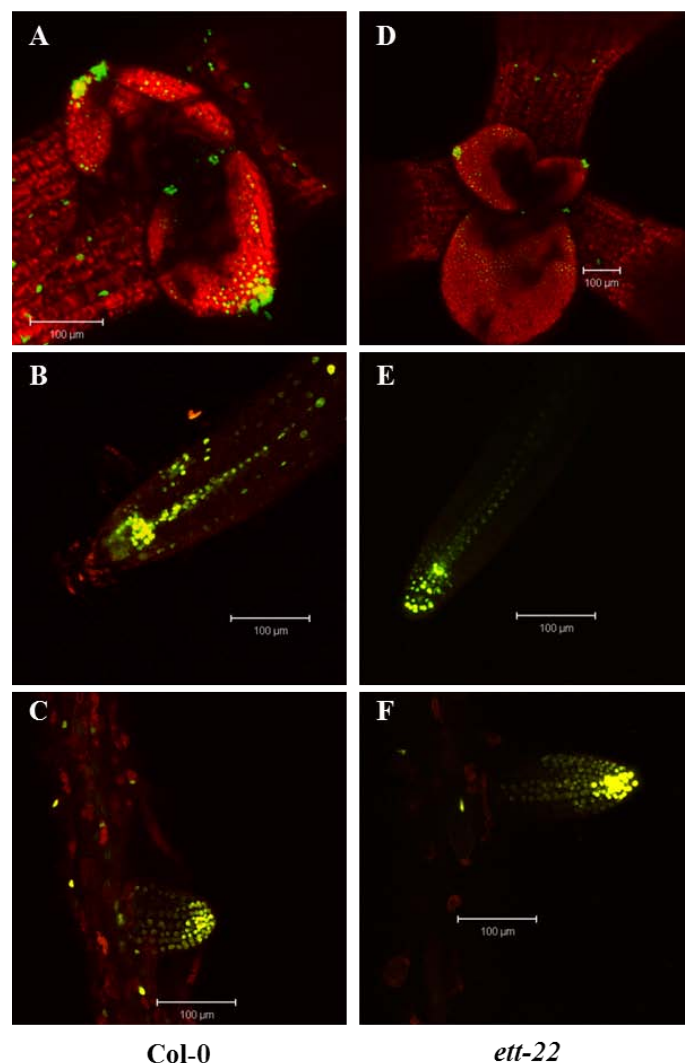


Figure I-22 : ETT ne modifie pas le signal DR5 dans les feuilles et les racines.

Observations en microscopie confocale du signal DR5 dans (A, D) des jeunes feuilles, (B, E) de pointes racinaires de racines principales et (C, F) de racines latérales de plantes (A-C) sauvages Col-0 et (D-F) mutantes *ett-22*. Les barres d'échelle représentent 100μm.

	- AXR	- <i>axr</i>	35S::ETTm AXR	35S::ETTm <i>axr</i>
- AXR	- / - AXR/AXR	- / - AXR/ <i>axr</i>	- / 35S::ETTm AXR/AXR	- / 35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>
- <i>axr</i>	- / - AXR/ <i>axr</i>	- / - <i>axr</i> / <i>axr</i>	- / 35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>	- / 35S::ETTm <i>axr</i> / <i>axr</i>
35S::ETTm AXR	- / 35S::ETTm AXR/AXR	- / 35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>	35S::ETTm/35S::ETTm AXR/AXR	35S::ETTm/35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>
35S::ETTm <i>axr</i>	- / 35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>	- / 35S::ETTm <i>axr</i> / <i>axr</i>	35S::ETTm/35S::ETTm AXR/ <i>axr</i>	35S::ETTm/35S::ETTm <i>axr</i> / <i>axr</i>

Tableau 1 : Test de complémentation du mutant *axr3-3* par la sur-expression d'ETT.

Génotypes théoriques de la descendance F2 du croisement entre *axr3-3* et 35S::ETTm. Les plantes sensibles au BASTA sont indiquées en rouge et les plantes sauvages pour le gène AXR3/IAA17 sont indiquées en bleu.

codée par le gène rapporteur DR5-VENUS sur des feuilles et des racines sauvage et mutante (Figure I-22). Chez la plante sauvage exprimant DR5-VENUS, le signal est détecté à l'apex des feuilles et à la pointe racinaire de la racine principale et des racines latérales, ce qui est cohérent avec les données déjà publiées. Chez la plante mutante *ett-22* exprimant DR5-VENUS, la localisation du signal est identique à celui observé chez une plante sauvage. Ces données suggèrent que le patron d'expression du gène rapporteur *DR5-VENUS* ne serait pas modifié dans des feuilles et des racines de plante mutante *ett* par rapport à des plantes sauvages. Cependant la technique d'imagerie ne permet pas une quantification fine du signal. Il sera donc nécessaire de quantifier le niveau d'expression de DR5 par RT-PCR quantitative afin de savoir si son expression est impactée par une différence du niveau d'expression d'ETT.

4- La surexpression d'ETT ne semble pas restaurer le phénotype du mutant *axr3-3*

Le mutant gain de fonction *axr3* présente une mutation dans le domaine DII du gène *IAA17*. La protéine AXR3/IAA17 n'est donc pas dégradée en présence d'auxine. ETT inhibant l'expression d'*IAA17*, on peut supposer que la surexpression d'ETT pourrait restaurer en partie le phénotype du mutant *axr3* en diminuant l'expression du gène. Pour cela, nous avons croisé la lignée p35S::ETTm avec la lignée mutante *axr3-3*. La génération F1 issue du croisement est hétérozygote pour le transgène p35S::ETTm ainsi que pour la mutation *axr3-3*. La mutation *axr3* étant dominante, si les plantules de la génération F1 présentent un phénotype identique à celui de la plante mère *axr3-3*, on peut supposer que le transgène p35S::ETTm, bien que présent à l'état hétérozygote, ne restaure pas le phénotype du mutant *axr3-3*. La génération F2 issue de l'autofécondation de la génération F1, est semée sur un milieu nutritif additionné de glufosinate d'ammonium (BASTA). Le BASTA permet de sélectionner le transgène p35S::ETTm. Les plantules de la génération F2 résistantes au BASTA possèdent donc toutes le transgène p35S::ETTm. A priori, 25% des plantes de la génération F2 sont sauvages pour l'allèle AXR3, 25% sont homozygotes pour la mutation *axr3* et 50% sont hétérozygotes pour la mutation *axr3*. Parmi ces plantes, environ 33% devraient être homozygotes pour le transgène. Si on suppose que la sur-expression d'ETT dans les plantes homozygotes pour le transgène est capable de restaurer le phénotype du mutant *axr3*, on devrait théoriquement obtenir 50% de plantes ayant un phénotype sauvage (Tableau 1). Si par contre on suppose que la sur-expression d'ETT n'est pas capable de restaurer un phénotype sauvage chez le mutant *axr3*, on devrait obtenir seulement 25% de

plantes F2 ayant un phénotype sauvage. Sur les 42 plantes résistantes au BASTA, 9 plantes seulement ont un phénotype sauvage soit 21,4% des plantes. Ce résultat suggère que la sur-expression d'*ETT* ne serait pas capable de restaurer le phénotype du mutant *axr3-3*. Cependant, on ne peut pas exclure l'existence d'un biais dans les ségrégations. De plus, sur les plantes de la génération F2, j'ai analysé uniquement certains aspects du phénotype d'*axr3* à savoir la taille des plantes, l'incurvation des feuilles et la réponse de croissance des racines par rapport à la gravité. Cependant, le mutant *axr3* présente d'autres aspects phénotypiques tels que l'absence de poil racinaire ou l'absence d'élongation de l'hypocotyle à l'obscurité (Barley, 2004; Tanimoto et al., 2007). Il faudrait donc analyser plus en détail le phénotype de la génération F2 issu du croisement entre *axr3-3* et p35S::*ETT*_m et surtout, génotyper les plantes afin d'être vraiment certain de l'absence de complémentation.

E- ARF4 régule-t-il les mêmes gènes cibles qu'ETT ?

L'analyse du phénotype du simple mutant *ett* et du double mutant *arf4 ett* montre une redondance partielle entre *ETT* et *ARF4*. Le fait qu'ils soient deux proches paralogues avec un patron d'expression très proche permet de supposer qu'ils pourraient réguler au moins en partie, les mêmes gènes cibles et qu'ils pourraient également interagir physiquement.

1- Obtention d'une lignée inductible surexprimant *ARF4*

Afin de déterminer si *ARF4* régule les mêmes gènes cibles qu'*ETT*, nous avons adopté la même stratégie que pour *ETT* et avons réalisé une construction comprenant la séquence codante du gène *ARF4* fusionnée au domaine GR sous le contrôle du promoteur (p35S). Cette construction p35S::*ARF4*-GR a été introduite dans des plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 et les plantes exprimant une seule copie du transgène ont été sélectionnées. Les résultats préliminaires obtenus après induction d'*ARF4*-GR et mesure du niveau d'expression des 16 gènes cibles d'*ETT* sur des inflorescences et des plantules ne nous permettent pas de conclure. Ces expériences ont besoin d'être répétées et validées statistiquement.

52

2- Interaction protéique entre *ETT* et *ARF4* ?

Afin de tester une éventuelle interaction entre *ETT* et *ARF4*, j'ai utilisé la technique de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC : "Bimolecular Fluorescence Complementation"), permettant de visualiser les interactions *in planta*. Pour chaque protéine à tester, on fusionne soit la partie C-terminale de la protéine fluorescente jaune (YFP) YC soit la partie N-terminale YN en amont ou en aval de la protéine d'intérêt. On réalise donc quatre constructions pour chaque protéine à tester. Pour évaluer l'interaction entre deux protéines candidates, on teste seize combinaisons possibles. On utilise également une construction permettant de localiser le noyau des cellules. Cette construction contient la protéine H2B (histone localisée dans le noyau) fusionnée à la protéine fluorescente rouge (RFP) sous le contrôle d'un promoteur fort (pActine11 ::H2B-mRFP). Des cellules d'épiderme de feuilles de tabac sont co-transformées transitoirement avec trois types de constructions : celle marquant le noyau des cellules et les deux constructions testant une interaction protéique (par exemple : YN-ETT et ARF4-YC). On utilise en parallèle comme témoin positif, la protéine ZmOCL1 qui s'homodimérise dans le noyau (Depege-Fargeix et al., 2011). Les résultats sont

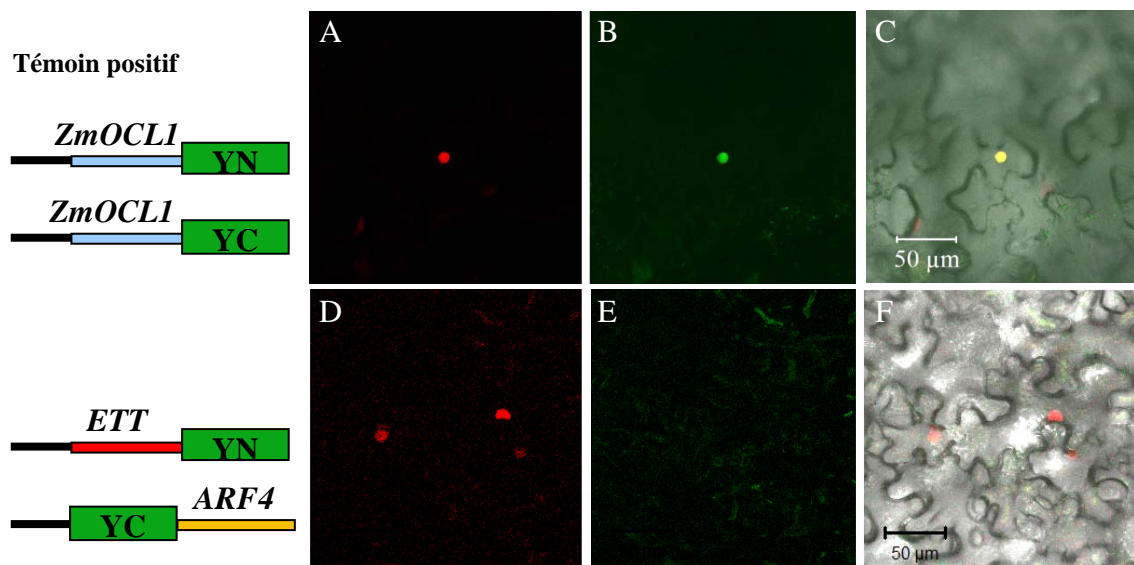


Figure I-23 : Test d'interaction entre ETT et ARF4 en BiFC.

A gauche, schémas des constructions testées en BiFC. A droite, images en microscopie confocale de cellules d'épiderme de feuilles de *Nicotiana Benthamiana*. (A, D) La fluorescence rouge permet de localiser le noyau des cellules (pActine11::H2B-mRFP), (B, E) la fluorescence verte indique la reconstitution de la YFP provoquée par l'interaction des deux protéines testées et (C, F) la superposition des deux canaux de fluorescences. Les barres d'échelle représentent 50μm. (C) La couleur jaune en C confirme l'homodimérisation de ZmOCL1 dans le noyau.

présentés sur la figure I-23 et montrent que sur les feuilles transformées avec les constructions du témoin positif et le marqueur nucléaire, plusieurs cellules présentent un signal YFP qui co-localise avec le signal RFP (marqueur nucléaire). Aucun signal YFP n'est en revanche, détectable pour l'interaction entre ETT et ARF4. Au vu de ces résultats, nous avons pensé que si l'interaction entre ETT et ARF4 nécessitaient la présence d'un co-facteur peut-être absent chez *Nicotiana benthamiana*, les mêmes expériences effectuées chez *Arabidopsis* seraient peut-être plus concluantes. J'ai donc renouvelé les expériences avec ETT et ARF4 sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, mais malheureusement, je n'ai pu mettre en évidence aucune interaction (résultats non montrés).

La technique du BiFC ne nous a donc pas permis de conclure sur la présence ou l'absence d'une interaction protéique entre ETT et ARF4. Le BiFC utilise des protéines fluorescentes fusionnées aux protéines d'intérêt, ce qui peut interférer avec la conformation spatiale de la protéine d'intérêt. Il serait donc judicieux d'utiliser d'autres techniques telles que le double hybride ou la résonance plasmonique de surface (SPR) utilisée pour mettre en évidence une interaction entre deux molécules. Enfin, l'obtention de lignées transgéniques exprimant une version inductible d'ARF4 devrait nous permettre d'identifier des gènes cibles d'ARF4 et ainsi de mieux comprendre comment ce facteur de transcription fonctionne avec ETT.

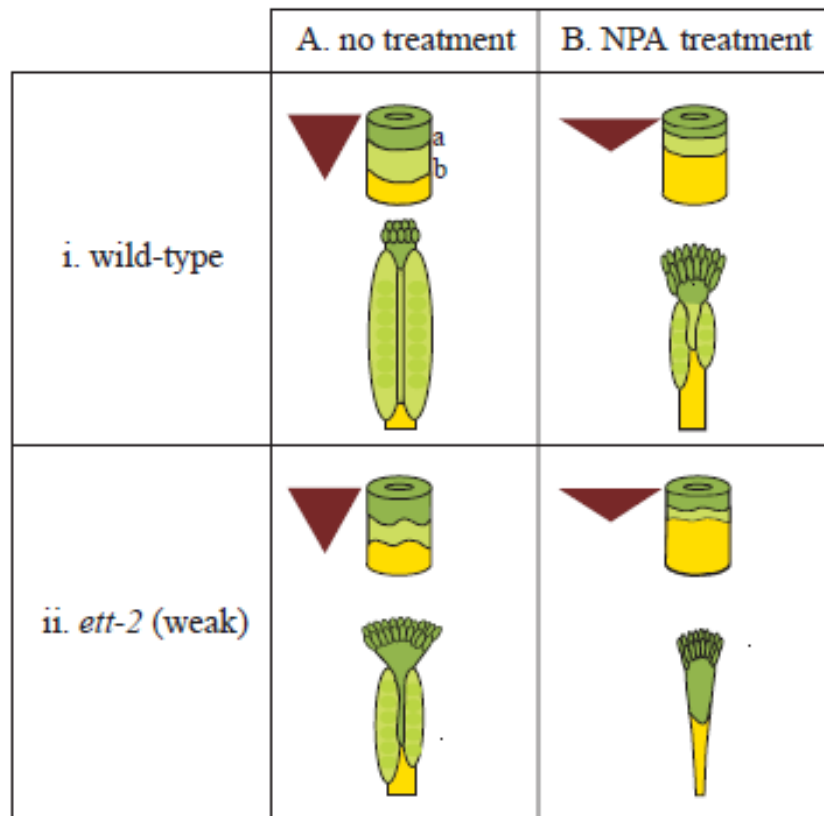


Figure II-1 : Modèle de "Nemhauser" proposant un gradient d'auxine le long de l'axe apico-basal du gynécée.

Les différents tissus du gynécée sont indiqués : vert foncé pour le style/stigmate, vert clair pour l'ovaire et jaune pour le gynophore. Le triangle marron indique la concentration relative en auxine et le sens du flux d'auxine. Le cylindre représente le gynécée à un stade précoce. Les lignes horizontales a et b représentent les frontières entre les différentes régions du gynécée qui sont définies par la concentration d'auxine, supposée agir comme un morphogène (d'après Nemhauser et al., 2000).

II-Auxine et gynécée

Nous avons vu précédemment que le gynécée possède différents axes de polarité et un agencement précis des différents tissus le composant. Plusieurs gènes, impliqués dans la signalisation et la distribution de l'auxine, présentent lorsqu'ils sont mutés des défauts de morphogenèse du gynécée. Le mutant *pinoid* (*pid*) par exemple, présente un phénotype carpellaire sévère avec une absence d'ovaire et un problème dans la mise en place de l'axe de polarité apico-basal (Bennett, 1995). Le gène responsable de cette mutation code la protéine PINOID qui régule la localisation polaire des protéines d'efflux d'auxine PIN1 au niveau des cellules (Benjamins et al., 2001; Friml et al., 2004). Le phénotype du mutant *pid* est similaire à celui du double mutant *yucca1 yucca4*, dont les gènes codent des flavine monooxygénases qui catalysent la biosynthèse d'auxine (Cheng et al., 2006; Zhao et al., 2001; Zhao et al., 2002). De la même façon, les gynécées des mutants *ettin/arf3* et *arf5* présentent une réduction des valves et un envahissement de l'ovaire par les tissus apicaux (Hardtke and Berleth, 1998; Przemeck et al., 1996; Sessions et al., 1997). Les gènes *ETT* et *ARF5* appartiennent à la famille des ARF dont le rôle, comme nous l'avons vu précédemment, est essentiel dans la signalisation de l'auxine. Les phénotypes de ces différents mutants affectés dans la biosynthèse, le transport ou la voie de signalisation de l'auxine suggèrent un rôle important de l'auxine dans la morphogenèse du gynécée. De plus, l'application de NPA, qui provoque une internalisation des protéines membranaires PIN1 et qui est couramment utilisé pour perturber le transport polarisé de l'auxine (Bailly et al., 2008; Cox and Muday, 1994; Luschnig, 2001), renforce l'hypothèse selon laquelle l'auxine jouerait un rôle important dans la morphogenèse du carpelle. En effet, en présence de NPA, la répartition des différents tissus le long de l'axe apico-basal du gynécée est affectée : les tissus apicaux, stigmate et style, prolifèrent, les valves diminuent et le gynophore s'allonge (Nemhauser et al., 2000). Afin d'expliquer le rôle de l'auxine dans la répartition des différents tissus le long de l'axe apico-basal du gynécée, en 2000, Nemhauser et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que la synthèse d'auxine a lieu à l'apex du gynécée et que le flux d'auxine est descendant. A partir de ces postulats, ils en déduisent qu'il existe, au cours des stades précoces du développement du gynécée (stade 6 à 8), un gradient d'auxine décroissant de l'apex vers la base, permettant la mise en place des différents tissus (Figure II-1). Ils proposent un modèle où l'auxine agirait comme un morphogène, c'est-à-dire qu'une forte concentration d'auxine engendrerait la différenciation du style et du stigmate, une concentration intermédiaire permettrait le développement des

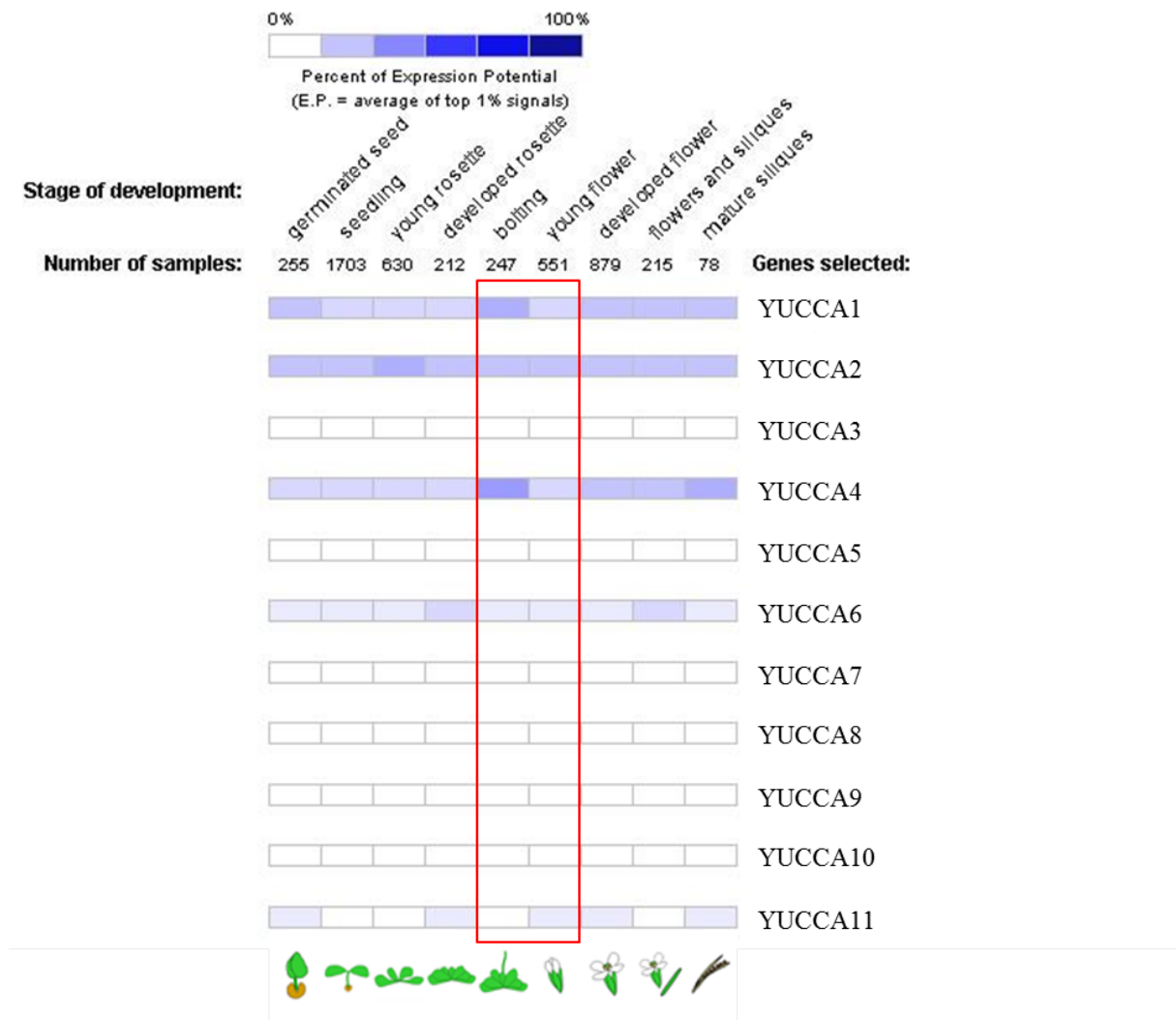


Figure II-2 : Expression des gènes *YUCCA* chez *Arabidopsis*

Niveaux d'expression des différents gènes *YUCCA* (indiqués à droite) exprimés en pourcentage d'expression potentielle et représenté par l'intensité de la couleur violette chez *Arabidopsis*, à différents stades de développement indiqués en haut de la Figure (d'après Genevestigator).

valves, alors qu'une faible concentration voire une absence d'auxine provoquerait la différenciation du gynophore (figure II-1iA). Dans ce modèle (figure II-1iA), deux frontières (a et b) marquent des niveaux seuil d'auxine. La première frontière (a) se situe entre le style et stigmate (vert foncé) et les valves (vert clair) et la deuxième frontière sépare les valves du gynophore (jaune). Ce modèle est étayé par le phénotype du gynécée après traitement au NPA. En effet, selon les postulats de départ, lorsque l'on bloque le transport d'auxine, sa quantité s'accroît à l'apex et s'amenuise à la base du gynécée. La répartition de l'auxine le long du gynécée est donc modifiée ce qui provoque un déplacement des frontières engendrant l'accroissement de la zone apicale (style/stigmate) et de la zone basale (gynophore) et la réduction de la zone médiane (ovaire) (figure II-1iB). Ce phénotype rappelant le phénotype du mutant *ettin*, les auteurs proposent que le rôle d'ETT serait d'établir les frontières a et b, marquant le début et la fin des valves. Ainsi, ETT permettrait le développement des valves en diminuant le niveau de réponse à l'auxine. D'après sa séquence, ETT serait un ARF inhibiteur et pourrait se fixer sur les gènes de réponse à l'auxine et ainsi, par compétition, empêcher l'activation de ces derniers par les ARF positifs. Cependant aucune donnée n'a permis, jusqu'à présent, d'affirmer ou d'infirmer ces différentes hypothèses.

Dans le but de vérifier l'hypothèse de Nemhauser, mon objectif a été d'étudier la direction des flux d'auxine lors du développement du gynécée et la présence éventuelle d'un gradient d'auxine, ainsi que la réponse à l'auxine et l'implication d'ETT dans cette réponse.

55

A- L'auxine est-elle synthétisée à l'apex du gynécée?

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe deux grandes voies de biosynthèse d'auxine : une voie indépendante du tryptophane et une voie dépendante du tryptophane. La première voie a été assez peu étudiée, quant à la deuxième voie, elle se subdivise en quatre. Parmi les différentes protéines impliquées dans ces voies de biosynthèse d'auxine, je me suis intéressée aux protéines YUCCA dont certains doubles mutants, tels que *yucca1 yucca4*, présentent des défauts de développement du carpelle (Cheng et al., 2006). La famille YUCCA (*YUC*) compte onze membres dont cinq sont exprimés dans la fleur; *YUC1*, 2 et 4 sont fortement exprimés alors que *YUC6* et 11 le sont plus faiblement (figure II-2). Les travaux de Cheng et coll. (2006) montrent que les gènes *YUC2* et *YUC4* sont principalement localisés à l'apex du gynécée au stade 12, *YUC2* est également exprimé dans les tissus vasculaires (figure II-3.D-3 ; E-3). A ce stade, le patron d'expression de *YUC1* est similaire à celui de

NON-LIBRE DE DROIT

Figure II-3 : Patron d'expression des gènes *YUCCA2* et *YUCCA4*.

Révélation de l'activité GUS dans des inflorescences exprimant la construction pYUC4::GUS (D-2 à D-4) et pYUC2::GUS (E-2 à E-4) (d'après Cheng et al., 2006).

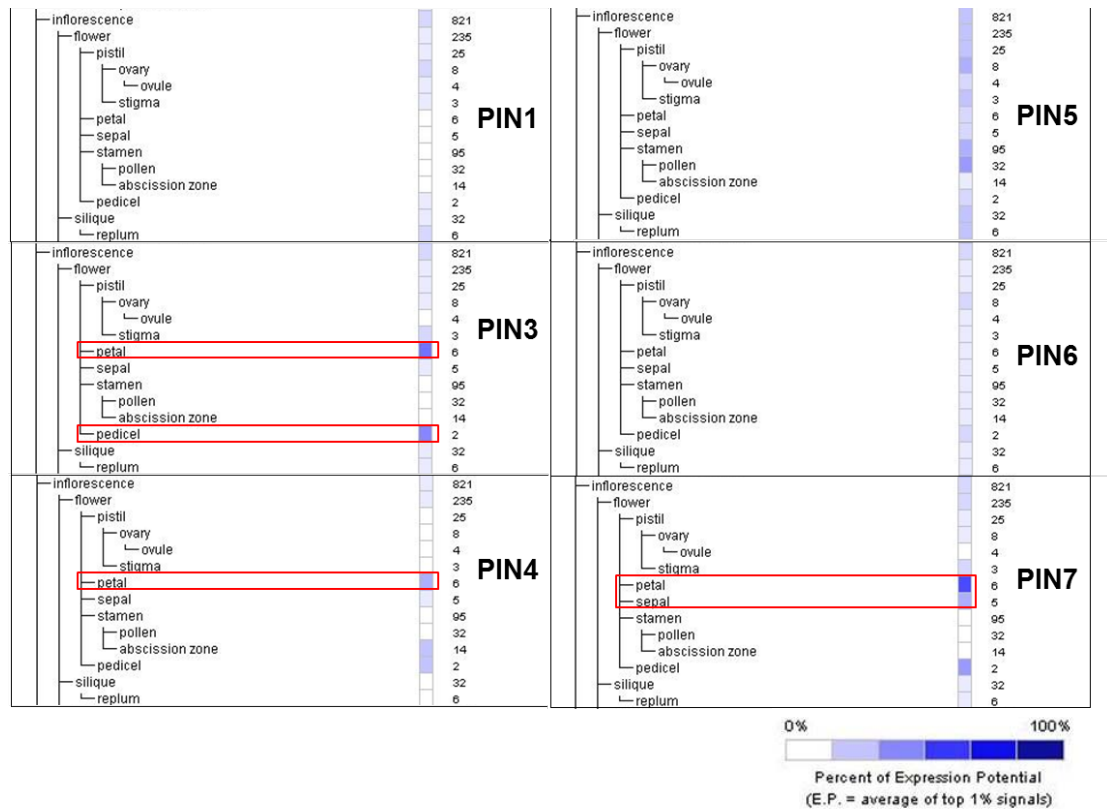


Figure II-4 : Expression de gènes *PIN* dans les différents tissus de la fleur d'Arabidopsis.

Le niveau d'expression de *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN5*, *PIN6* et *PIN7* dans les différents tissus de la fleur d'Arabidopsis est exprimé en pourcentage du potentiel d'expression et représenté par l'intensité de la couleur violette (d'après Genevestigator).

YUC4 (données de Cheng et coll. (2006)). Au stade 6, *YUC1* et *YUC2* sont exprimés dans l'ensemble du gynécée, cependant, l'expression de *YUC1* semble plus forte dans la zone abaxiale du carpelle. Au stade 7, *YUC4* est fortement exprimé à la base du carpelle, au niveau des frontières des organes et de la dépression au centre du gynécée, et faiblement exprimé dans un nombre très restreint de cellules à l'apex du gynécée (figure II-3.D-2-1) (Cheng et al., 2006). De plus, ces auteurs ont montré le rôle de ces gènes dans la production d'auxine *in planta* et leur importance dans la formation des organes floraux. Ces données, ultérieures à l'article de Nemhauser, confirment une production d'auxine à l'apex du gynécée mais montrent par contre, que cette production n'est pas restreinte à l'apex du gynécée.

B- L'auxine est-elle pompée de haut en bas?

Pour tenter d'analyser la direction des flux d'auxine, je me suis intéressée aux transporteurs d'efflux d'auxine, les protéines PIN. La famille *PIN* se compose de huit gènes dont les niveaux d'expression ne sont pas homogènes au cours du développement de la plante et dans les différents tissus (Annexe 5). L'expression de *PIN2* et *PIN8* n'est pas détectée dans les organes floraux alors que les autres protéines PIN sont présentes mais à des niveaux d'expression différents (Annexe 5). *PIN1* est moyennement exprimé dans la fleur et son expression se restreint à l'ovaire. *PIN3* et *PIN4* sont faiblement exprimés dans la fleur et leur expression est majoritairement détectée dans les pétales et également dans le pédicelle pour *PIN3*. *PIN5* est fortement exprimé dans l'ovaire et les étamines, moyennement exprimé dans le stigmate et plus faiblement exprimé dans les pétales et les sépales; alors que *PIN6* est exprimé très faiblement dans toutes les pièces florales (Figure II-4). Enfin, *PIN7* est exprimé préférentiellement dans les pétales et les sépales ainsi que dans le pédicelle (Figure II-4).

D'après ces données, j'ai choisi d'analyser la localisation de la protéine PIN1 qui, au niveau de la fleur, semble spécifique du gynécée. J'ai analysé en particulier les stades précoces du développement du gynécée (stade7/8), stades au cours desquels existerait, selon l'hypothèse de Nemhauser, un gradient d'auxine. J'ai effectué des expériences d'immunolocalisation avec un anticorps spécifique de PIN1 sur des coupes longitudinales de gynécée. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure II-5A. On constate que la protéine PIN1 est principalement visible sur la première couche cellulaire (L1) et au niveau des tissus vasculaires. Sur les épidermes abaxial et adaxial des carpelles en cours d'élongation, PIN1 se situe sur la face apicale des cellules. On peut donc en déduire qu'il y aurait un flux ascendant

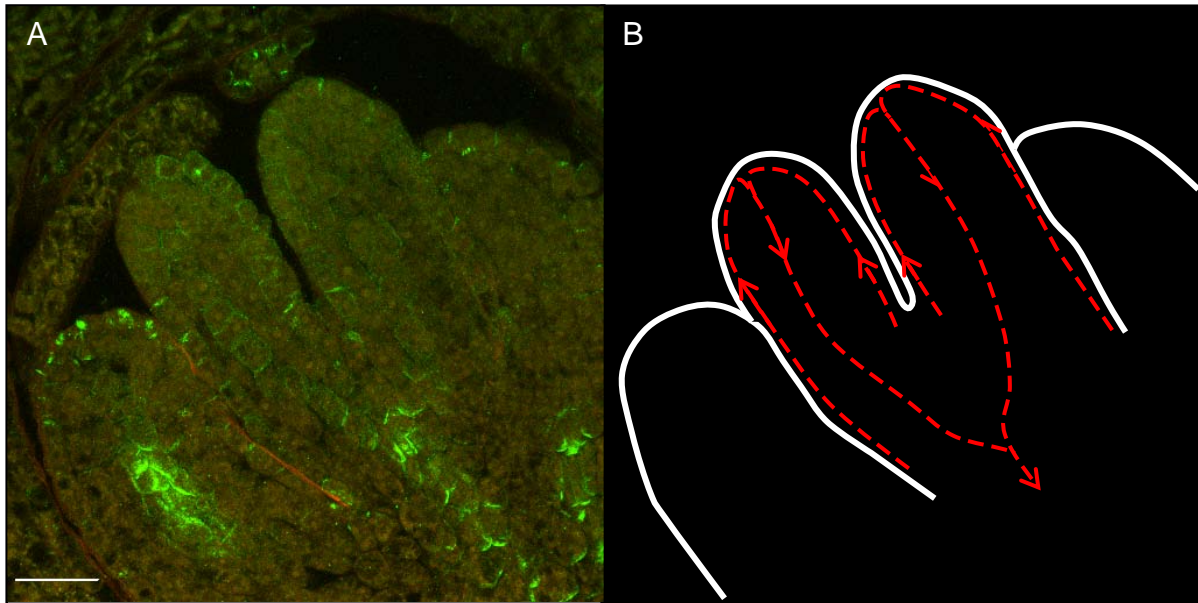


Figure II-5: Flux d'auxine putatifs dans le gynécée.

(A) Immunolocalisation de PIN1 (signal vert) sur une coupe longitudinale de fleur au stade 7. La protéine PIN1 étant localisée à la membrane plasmique et polarisée au niveau cellulaire, le signal se présente sous forme de traits marquant une face cellulaire. (B) Dédution des flux putatifs d'auxine (pointillés rouges) à partir de la position des protéines PIN1. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

d'auxine au niveau de la couche L1 du gynécée faisant converger l'auxine à l'apex des valves. Cependant, dans la zone vasculaire, PIN1 se situe sur la face basale des cellules, ce qui laisse penser que le flux serait descendant. Les flux potentiels d'auxine au sein du gynécée au stade 7, d'après la localisation de PIN1, sont schématisés sur la figure II-5B par la courbe rouge en pointillé. On observe la même disposition au niveau des primordia d'anthères. La répartition des protéines PIN1 observées sur un carpelle est similaire aux résultats obtenus sur les primordia floraux émergeant de la périphérie du méristème apical (Benkova et al., 2003; de Reuille et al., 2006). Ces données suggèrent qu'au niveau des flux d'auxine, chaque carpelle se comporterait comme un primordia d'organe individuel malgré la fusion des deux carpelles.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'hypothèse de Nemhauser repose sur des postulats de départ incomplets. Tout en conservant le raisonnement de Nemhauser, j'ai ajouté à son modèle les nouvelles données disponibles actuellement. L'auxine serait produite en grande partie à la base du gynécée mais également à l'apex et le transport polarisé de l'auxine au sein du gynécée serait à la fois ascendant et descendant. Avec ces nouvelles données, on peut imaginer que lorsque l'on bloque le transport polarisé d'auxine par un traitement au NPA, l'auxine devrait s'accumuler à la fois à l'apex et à la base du gynécée dans des zones assez restreintes. On ne peut donc plus expliquer le phénotype simplement en fonction de la quantité d'auxine.

C- Comment mesurer la quantité d'auxine *in planta*?

L'idéal serait de pouvoir visualiser directement l'existence éventuelle d'un gradient d'auxine au cours des stades précoces de développement du gynécée. Cependant, aucun outil ne nous permet actuellement de visualiser clairement directement la quantité d'auxine *in situ*. Au milieu des années 90, la séquence d'ADN reconnue par les ARF a été identifiée et nommée AuxRE (Auxin Response Element) (Ulmasov et al., 1995). Des répétitions de cette séquence (TGTCTC) couplées à un promoteur minimal ont été montrées comme étant nécessaires et suffisantes pour activer la transcription d'un gène rapporteur de façon auxine dépendante (Friml et al., 2003; Heisler et al., 2005; Ulmasov et al., 1995). Cette construction, appelée DR5, est utilisée depuis comme marqueur de la réponse à l'auxine. Son activation dépend, non seulement, de la présence d'auxine, mais également, de la capacité de la cellule à intégrer ce signal, c'est-à-dire, de la présence de protéines impliquées dans la dégradation des Aux/IAA, mais aussi, de la présence d'ARF capable d'activer les gènes de réponse à l'auxine.

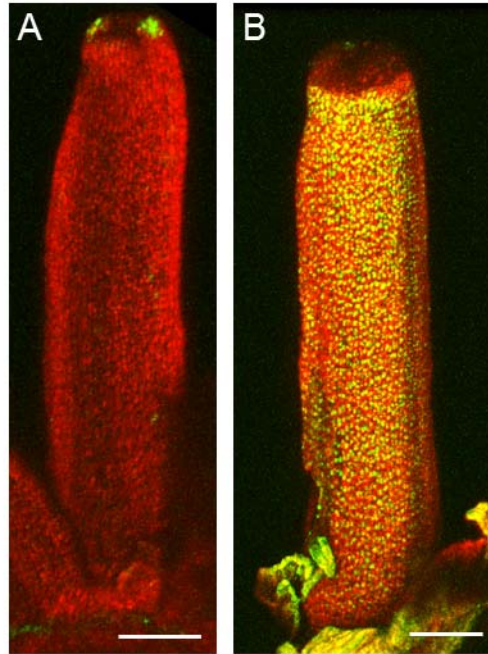


Figure II-6 : Gynécée et gradient d'auxine.

Images obtenues en microscopie confocale *in vivo* sur des gynécées au stade 10 exprimant la construction DR5 (A) et DII (B). La barre d'échelle représente 100μm.

Ce marqueur est donc assez tardif puisqu'il reflète la réponse finale de la cascade de signalisation de l'auxine. Récemment, un nouveau senseur nommé DII a été développé dans l'équipe. L'idée était de produire une protéine fluorescente qui serait d'autant plus dégradée que la quantité d'auxine dans la cellule serait importante. Il se trouve que le domaine DII des Aux/IAA est reconnu par le complexe SCF^{TIR1} en présence d'auxine, ce qui engendre la dégradation de la protéine. Le senseur DII est composé de la séquence codante du domaine DII fusionnée à la séquence codante de la protéine fluorescente Venus sous le contrôle du promoteur minimal CaMV 35S (Vernoux et al., 2011). Cette construction permet de mesurer la quantité d'auxine "active" puisqu'elle permet de mesurer indirectement l'effet de l'auxine sur la dégradation des Aux/IAA.

Par rapport à la voie de signalisation de l'auxine, le signal DR5 représente une signalisation sortante tandis qu'un signal de DII représente une absence de dégradation donc, de signalisation entrante. Typiquement, au niveau des initia du méristème d'inflorescence, le signal DII est absent alors que le signal DR5 est présent, traduisant une quantité d'auxine suffisante pour la dégradation du senseur DII, et une réponse à l'auxine suffisante pour activer DR5 (de Reuille et al., 2006; Vernoux et al., 2011). Pour la première fois, nous disposons avec le senseur DII, d'un outil permettant d'étudier l'existence d'un éventuel gradient d'auxine dans le gynécée. L'étude parallèle des senseurs DII et DR5 devrait permettre de mieux comprendre les signaux entrants et sortants dans les différentes zones du gynécée.

Dans un premier temps, j'ai visualisé *in vivo* les deux senseurs DR5 et DII en observant les signaux fluorescents au microscope confocal. J'ai obtenu les images présentées dans la figure II-6 où l'on peut voir des carpelles au stade 10. A ce stade, l'allongement du gynécée est terminé mais son apex ne s'est pas encore fermé. Sur ces images, on accède principalement au signal de la première couche cellulaire (L1) et on constate que le marquage de DR5 se restreint à deux zones distinctes à l'apex du gynécée alors que le marquage de DII semble homogène tout le long du gynécée. La présence de DR5 à l'apex du carpelle est cohérente avec l'idée que l'auxine est produite à l'apex du gynécée et qu'elle est associée à une signalisation active au sommet de chaque valve ce qui se traduit par la présence de deux points au niveau du marquage. Quant au marquage de DII, il nous indique que la quantité d'auxine dans le reste du gynécée est faible, en tout cas assez faible pour ne pas dégrader la totalité du senseur DII, au moins dans la couche L1.

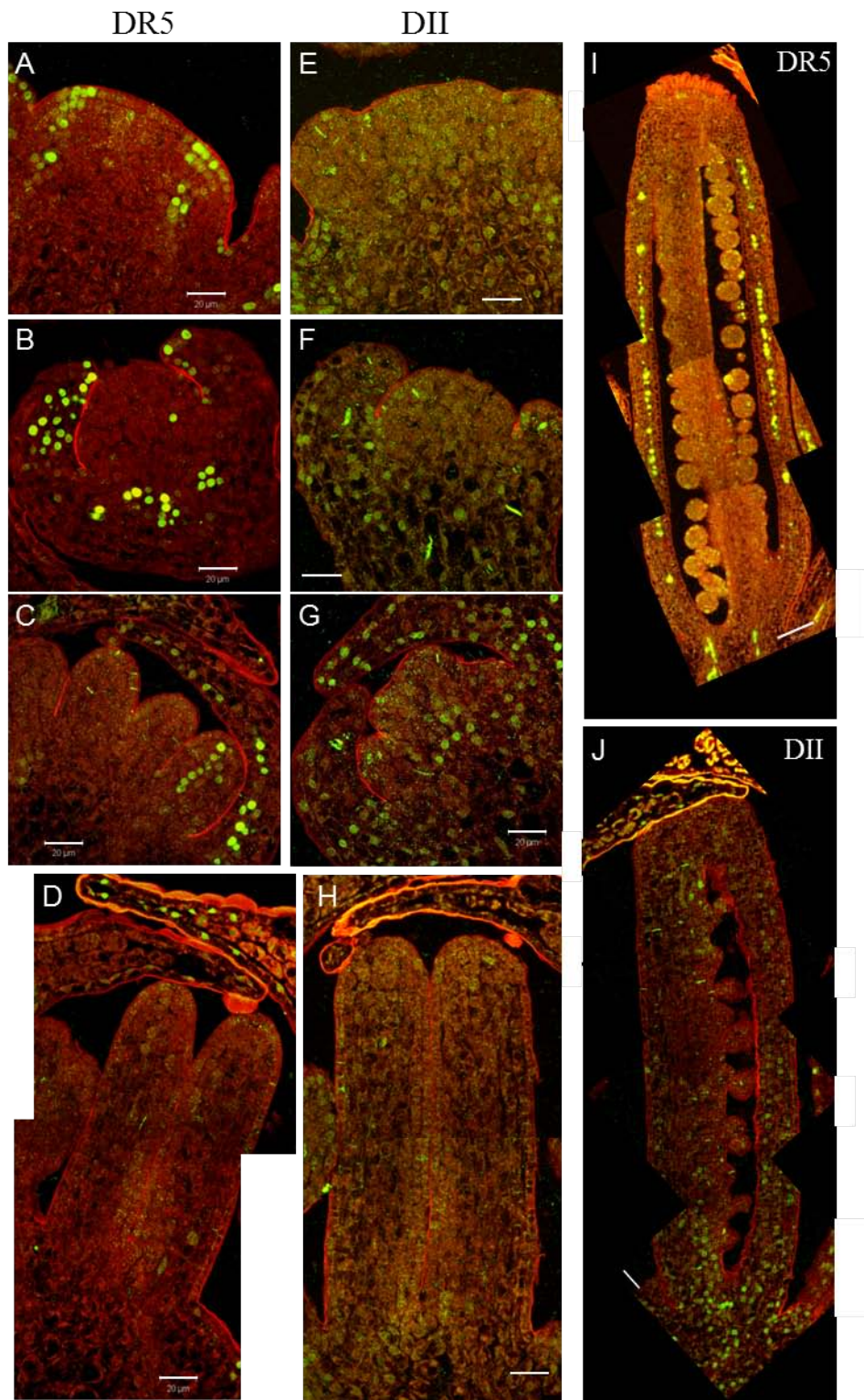


Figure II-7 : Gynécée en développement et gradient d'auxine.

Immunolocalisation avec un anticorps anti-VENUS sur des plantes Col-0 exprimant DR5 (A-D; I) et DII (E-H; J). Coupes longitudinales (A, E) de méristème d'inflorescence; (B, F) de fleurs au stade 4, (C, G) de fleurs au stade 7 précoce, (D, H) de gynécées au stade 8 et (I-J) de gynécées au stade 11. La barre d'échelle correspond à 20µm (A-H) et à 50µm (I-J).

Les stades plus précoces de développement du gynécée sont inaccessibles car recouverts par les sépales. De plus, le microscope confocal ne nous permet pas de visualiser l'ensemble des couches cellulaires en particulier en profondeur. Afin de contourner ce problème et afin de pouvoir analyser tous les stades de développement et toutes les couches cellulaires, j'ai réalisé des coupes histologiques d'inflorescences à partir de plantes exprimant soit la construction DR5 soit la construction DII, que j'ai utilisées dans des expériences d'immunolocalisation à l'aide d'un anticorps spécifique de la protéine VENUS (utilisée comme rapporteur dans les deux cas). Des coupes longitudinales d'inflorescences à différents stades de développement sont présentées sur la figure II-7: le méristème d'inflorescence avec de jeunes primordia de fleur (A et E), une fleur au stade 4 (B et F), une fleur au stade 7 (C et G), un carpelle au stade 8 (D et H) et un carpelle au stade 11 (I et J). Le signal vert correspond au marquage de DR5 (A-D ; I) et de DII (E-H ; J) et le signal rouge correspond à l'auto-fluorescence des tissus. Au niveau du méristème d'inflorescence, on observe l'activation de DR5 au niveau des initia (A). Au stade 4 du développement floral, on observe l'activation de DR5 sur la face adaxiale des sépales et au niveau du tissu conducteur à la base du méristème mais aucun signal n'est détecté dans le gynécée (B). Au stade 7, DR5 est activé au centre des primordia d'anthères et se maintient sur la face adaxiale des sépales (C). On note toujours une absence de signal dans le gynécée, ainsi qu'au stade 8 (D). Au stade 11, les différents tissus se sont différenciés et sont en cours de maturation et le signal DR5 se restreint au tissu vasculaire des valves carpellaires (I). La présence de DR5 au niveau des initia du méristème d'inflorescence est cohérent avec les données obtenues *in vivo* par Barbier de Reuille et coll. (2006). On remarque que sur l'ensemble des stades de développement floraux, le signal DR5 est absent du méristème floral et des carpelles, semblant indiquer que la réponse à l'auxine n'est pas activée. De façon intéressante, le signal DR5 observé sur la face adaxiale des sépales colocalise avec l'expression de l'ARF activateur ARF5 (Hardtke and Berleth, 1998).

Les données obtenues avec DII au niveau du méristème d'inflorescence montrent une expression du marqueur à la base du méristème (E). Au stade 4, DII est observé au niveau des sépales et à la base du méristème floral (F). Au stade 7, DII est présent sur l'ensemble des tissus excepté sur les primordia d'anthère et de gynécée (G). Au stade 8, DII est absent du gynécée (H) et au stade 11, il forme un signal décroissant de la base vers l'apex du gynécée (J). Au regard de ces résultats, on peut conclure que l'auxine est présente en quantité suffisante pour dégrader DII au niveau des différents primordia floraux d'anthères et de carpelle ainsi que du carpelle en cours d'élongation. On remarque, également, que la base de

la fleur est pauvre en auxine et au stade 11, le signal décroissant de DII semble indiquer la présence d'une quantité décroissante d'auxine de l'apex vers la base du gynécée.

Avant de conclure définitivement, il sera toutefois important de vérifier que le promoteur 35S qui a été utilisé pour contrôler l'expression des gènes rapporteurs DR5 et DII est bien actif dans tous les tissus. Pour DII, étant donné que c'est la protéine qui est dégradée par l'auxine, on pourra réaliser des hybridations *in situ* avec une sonde VENUS et vérifier que le transcrit est présent dans l'ensemble des cellules, en particulier dans le gynécée où aucun signal n'est détecté. Pour DR5, le promoteur minimal 35S a été couplé à plusieurs séquences AuxRE et on détecte donc la transcription du gène rapporteur seulement lorsque les ARF activateurs sont opérationnels. L'hybridation *in situ* ne nous dira donc pas si le promoteur fonctionne dans tous les tissus. Pour contourner ce problème, on pourra artificiellement augmenter la quantité d'auxine dans le gynécée en appliquant de l'auxine exogène et vérifier que l'expression de DR5 s'allume dans le gynécée.

Ces résultats sont donc préliminaires et nécessitent d'être étayés par les contrôles mentionnés ci-dessus. Dans l'hypothèse où ils seraient confirmés, si on regarde simultanément la signalisation entrante (DII) et la signalisation sortante (DR5) d'auxine, on remarque que l'absence de DII ne s'accompagne pas forcément de l'activation de DR5. Du stade 4 au stade 7, les marquages de DR5 et DII co-localisent sur la face adaxiale des sépales. On peut supposer que la quantité d'auxine n'est pas suffisante pour dégrader le senseur DII sur l'ensemble du sépale mais que, couplé à la présence d'ARF activateurs sur la face adaxiale du sépale, par exemple ARF5, cette quantité d'auxine est suffisante à l'activation de DR5. Toujours au cours des stades 4 à 7, les expressions de DII et DR5 sont indétectables dans le méristème floral alors qu'ARF5 y est fortement exprimé (Hardtke and Berleth, 1998). Au niveau du méristème floral, la présence d'auxine et d'ARF5 (ARF activateur) ne semble donc pas suffisante pour activer les gènes de réponse à l'auxine (DR5). On peut supposer que soit la quantité d'Aux/IAA est très importante, soit l'activité transcriptionnelle résultante de l'ensemble des ARF présents (ARF activateurs et inhibiteurs) est négative. De la même façon, au stade 8 où le gynécée connaît une croissance active, les signaux DR5 et DII sont également absents.

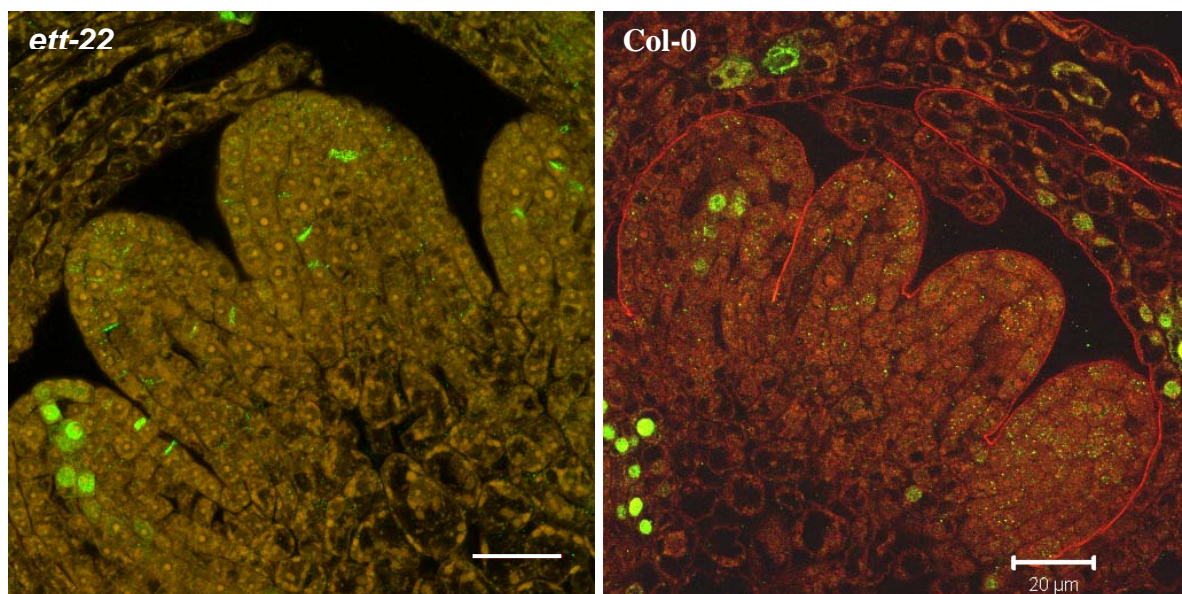


Figure II-8 : Effet d'ETT sur l'expression de DR5 dans le gynécée.

Immunolocalisation de DR5 (avec un anticorps anti-VENUS) sur une coupe longitudinale de gynécée de plante sauvage et de plante mutante *ett-22* au stade 7. La barre d'échelle correspond à 20μm.

En ce qui concerne l'existence possible d'un gradient d'auxine au niveau du gynécée, on n'observe pas de gradient aux stades précoces du développement (stade 6 à 8), comme supposé par Nemhauser. Cependant, on ne peut pas exclure non plus la présence d'un tel gradient. En effet, le marqueur DII ne nous permet pas de visualiser directement la quantité d'auxine mais reflète la dégradation des Aux/IAA en présence d'auxine. Si on part de l'hypothèse que ce gradient existe et que la plus petite quantité d'auxine du gradient est suffisante pour dégrader le senseur DII, alors on ne pourra pas visualiser le gradient à l'aide de ce senseur. Cependant, au stade 11, le marqueur DII montre un gradient de dégradation le long de l'axe apico-basal du gynécée, ce qui suggère la présence d'un gradient d'auxine à des stades plus tardifs. L'auxine serait plus abondante à l'apex du gynécée et sa quantité diminuerait en allant vers la base. L'observation d'un gradient d'auxine à ce stade développemental peut nous permettre de suggérer que ce gradient était déjà présent au cours des stades plus précoces. En effet, on peut imaginer que la quantité globale d'auxine s'amenuise au cours du développement de la fleur (dans les tissus âgés) alors ce gradient pourrait être également présent à des stades plus précoces, mais non-observable avec le marqueur DII trop sensible pour cette gamme de concentration d'auxine.

Enfin, je me suis intéressée au rôle d'ETT dans la morphogénèse du carpelle. Selon l'hypothèse de Nemhauser, ETT diminuerait la réponse à l'auxine favorisant ainsi la mise en place des frontières de l'ovaire. Nous avons, dans un premier temps, vérifié le patron d'expression d'*ETT* dans le gynécée au stade 7. On constate qu'*ETT* s'exprime fortement au niveau de la zone abaxiale du gynécée et que son expression est nettement plus faible à l'apex du gynécée mais également à sa base (Figure I-5). Cette différence d'expression est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle ETT déterminerait les frontières de l'ovaire. Toujours d'après l'hypothèse de Nemhauser, dans un mutant *ettin*, la répartition de l'auxine dans le carpelle serait inchangée, mais c'est l'interprétation de cette quantité qui serait perturbée. Ainsi, si l'on retire l'effet d'ETT par mutation du gène, on devrait augmenter la réponse à l'auxine (DR5) au niveau du gynécée. Cependant, chez le mutant *ettin*, on constate sur la figure II-8 que le signal DR5 est toujours absent du gynécée. Néanmoins, ces résultats ont besoin d'être confirmés en particulier en effectuant les contrôles mentionnés plus haut pour ce qui est de l'expression de DR5.

D- Discussion

Pour conclure ce chapitre, nous avons vu qu'au cours des stades précoces du développement du gynécée, la production d'auxine via *YUC4*, serait localisée à l'apex et à la base du gynécée et que le flux d'auxine, déduit à partir d'immunolocalisation sur le transporteur *PIN1*, serait ascendant dans la couche L1 et descendant au niveau des tissus vasculaires. Cependant, même si les gènes *YUC6* et *YUC11* sont faiblement exprimés dans la fleur, il serait intéressant de connaître leurs patrons d'expression. En effet, un niveau global d'expression faible en analyse sur puce à ADN peut être le reflet, soit d'une expression faible sur l'ensemble des tissus, soit d'une expression forte mais très localisée. De plus, les stades développementaux observés pour les gènes *YUC1* et *YUC2* sont plus précoces (stade 6) que le stade observé pour le gène *YUC4* (stade 7/8). Il serait donc intéressant de connaître le patron d'expression de l'ensemble des gènes *YUCCA* exprimés dans la fleur au stade 7. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'introduction, il existe différentes voies de synthèse d'auxine que je n'ai pas explorée. Lorsque l'on regarde les niveaux d'expression dans le gynécée de plusieurs protéines impliquées dans les différentes voies de synthèse d'auxine, telles que *CYP79B2*, *CYP79B3*, *TAA1* et *AMI1*, on constate que les gènes des deux premières sont absents du gynécée alors que *TAA1* est faiblement exprimé et que *AMII* est fortement exprimé (données obtenues à partir du site www.genevestigator.com). D'autres voies de synthèse d'auxine que celle impliquant les gènes *YUCCA* semblent donc actives dans le gynécée.

62

D'autre part, j'ai schématisé le flux d'auxine à partir de la localisation de *PIN1*, cependant d'autres protéines *PIN* sont présentes dans le gynécée. En effet, *PIN3*, *PIN5*, *PIN6* et *PIN7* sont exprimés dans le gynécée mais à des niveaux différents. *PIN5* est fortement exprimé dans l'ovaire et moyennement exprimé dans le stigmate alors que *PIN3*, *PIN6* et *PIN7* sont faiblement exprimés à la fois dans l'ovaire et le stigmate. Il serait donc également intéressant de connaître la localisation des protéines *PIN3*, *PIN5*, *PIN6* et *PIN7* au cours du développement du gynécée. Ces données, complétant les résultats que j'ai obtenus avec *PIN1*, permettraient de prédire de façon plus précise les flux d'auxine au sein des carpelles. Cependant, l'idéal aurait été de mesurer directement la concentration d'auxine plutôt que de faire des prédictions. Les résultats préliminaires obtenus à partir des senseurs *DR5* et *DII* suggèrent que l'auxine est présente dans le méristème floral et le gynécée aux stades précoces mais que la réponse à l'auxine ne semble pas y être activée. Par rapport à l'absence de signal *DR5* dans le gynécée, si cette absence est bien réelle et ne résulte pas d'un artefact, le patron

d'expression de l'ensemble des ARF et des Aux/IAA nous permettrait peut-être d'expliquer cette absence de signal DR5 dans le méristème floral et le gynécée en particulier. Malgré que nous n'ayons pas mis en évidence de gradient d'auxine au cours des stades précoces du gynécée, celui-ci serait effectivement présent à des stades plus tardifs (stade 11/12) et la signification de ce gradient à ce stade développementale du gynécée reste à éclaircir. Il est regrettable que le senseur DII ne nous ai pas permis de vérifier l'existence d'un gradient d'auxine afin de confirmer ou de faire évoluer le modèle de Nemhauser.

Les données de la bibliographie sur la localisation probable de la synthèse d'auxine via YUC4 suggèrent une forte concentration d'auxine à l'apex et à la base du gynécée. On peut supposer qu'une forte quantité d'auxine induirait le développement du style/stigmate et du gynophore, et que ce serait la présence de certains facteurs d'identité apicale ou basale qui permettrait la différenciation dans ces deux zones soit du style/stigmate soit du gynophore. Le développement des valves, quant à lui, serait promu par des concentrations d'auxine moyennes à faibles. L'hypothèse de Nemhauser sur le rôle d'ETT dans la morphogénèse du carpelle s'intègre parfaitement à ce scénario. ETT diminuerait la réponse à l'auxine favorisant ainsi la mise en place des frontières de l'ovaire. Dans un mutant *ettin*, la répartition de l'auxine dans le carpelle serait donc inchangée, mais c'est l'interprétation de cette quantité qui serait perturbée. Si on retire l'effet d'ETT, on augmente la réponse à l'auxine, et donc on favorise le développement des tissus induits par une forte concentration d'auxine, c'est-à-dire le style/stigmate et le gynécée, alors que les tissus nécessitant peu ou pas d'auxine, tels que les valves, diminuent au centre du carpelle. De façon à vérifier ce point, nous avons utilisé le gène rapporteur DR5 mais ETT ne semble pas influencer de manière drastique la réponse à l'auxine. Cependant, les résultats obtenus sont préliminaires et devront être confirmés. En particulier, nous devons absolument nous assurer que le promoteur 35S est actif dans le gynécée. D'autre part, la technique d'immunolocalisation de DR5 ne nous permet peut-être pas de visualiser de différence subtile de niveau d'expression. Afin de comparer le niveau d'expression de DR5 entre des gynécées de plantes sauvage et mutante *ett*, nous prévoyons de doser le niveau de transcrit VENUS par RT-PCR quantitative.

Le rôle exact d'ETT dans la morphogenèse du carpelle reste à déterminer. Nos données sont préliminaires et il reste encore beaucoup de travail avant de pouvoir comprendre le rôle de l'auxine dans la morphogenèse du carpelle. Cependant les perspectives de construire une cartographie de la signalisation de l'auxine au cours du développement du gynécée sont très excitantes.

NON-LIBRE DE DROIT

Figure III-1 : Représentation des domaines protéiques de la famille YABBY.

Les protéines de la famille YABBY sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés : un domaine à doigt de zinc C2C2 et un domaine hélice-boucle-hélice (appelé domaine YABBY), et trois domaines variables notés I, II et III (d'après Bowman, 2000).

III-Etude fonctionnelle de CRABS CLAW

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la morphogenèse du carpelle, notre équipe s'intéresse à plusieurs mutants d'*A. thaliana* dont la perte de fonction provoque une forte altération des carpelles dès les stades précoces de leur développement. Dans ce chapitre, je m'intéresse plus particulièrement au gène *CRABS CLAW* (*CRC*). La mutation du gène *CRC* engendre une absence de fusion du style et de la partie supérieure de l'ovaire, une augmentation de la taille des cellules, une réduction de la croissance longitudinale et une augmentation de la croissance radiale, ainsi qu'une absence des nectaires (Alvarez and Smyth, 1999; Bowman et al., 1999). Des ovules ectopiques se forment également sur la face externe des carpelles traduisant ainsi un défaut de mise en place de l'axe abaxial-adaxial. Néanmoins, ce phénomène rare est accentué chez les doubles mutants *gymnos crc* et *kanadi1 crc* (Eshed et al., 1999).

Le gène *CRC* code un facteur de transcription appartenant à la famille YABBY, famille de gènes spécifique des plantes. Chez *A. thaliana*, cette famille de gènes se compose de six membres. L'ensemble de ces gènes est exprimé de façon abaxiale dans au moins un type d'organe (Bowman and Smyth, 1999; Sarojam et al., 2010; Siegfried et al., 1999). Leur expression ectopique conduit à l'abaxialisation des tissus adaxiaux, ce qui suggère que la fonction première assurée par les membres de la famille YABBY est de déterminer l'identité abaxiale dans les organes latéraux (Bowman, 2000). Les gènes *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), *YABBY2* (*YAB2*) et *YABBY3* (*YAB3*) présentent un patron d'expression similaire : ils sont exprimés dans les régions abaxiales des organes aériens de la plante (Bowman and Smyth, 1999; Siegfried et al., 1999). Les niveaux d'expression de ces gènes semblent différents, en effet, l'intensité du marquage en hybridation *in situ* est très intense pour *FIL*, modérément intense pour *YAB3* et faible pour *YAB2* (Siegfried et al., 1999). Les gènes *CRABS CLAW* (*CRC*) et *INNER NO OUTER* (*INO*) ont un profil d'expression plus restreint (Siegfried et al., 1999). *CRC* est exprimé seulement au niveau du carpelle et des nectaires, et l'expression d'*INO* est limitée au tégument externe des ovules (Bowman, 2000; Meister et al., 2005; Siegfried et al., 1999). Les protéines de la famille YABBY sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés: un domaine à doigt de zinc C₂C₂ et un domaine "helix-loop-helix" ; et de trois régions variables I, II et III (figure III-1)(Bowman, 2000). Le domaine HLH possède une séquence à boîte HMG-1 ("Hight Mobility Group") au niveau de la première hélice. Ce domaine HMG-1, présent chez tous les eucaryotes, est connu pour être un

domaine de liaison à l'ADN. Chez l'homme, par exemple, la protéine SRY ("Sex determining Region of the Y chromosome") se lie à l'ADN via son domaine HMG (Mitchell and Harley, 2002). Chez *A. thaliana*, des études montrent que la protéine FIL se lie, également, à l'ADN via son domaine HMG (Kanaya et al., 2002). Ce domaine semble, également, impliqué dans les interactions protéine-protéine puisqu'il est suffisant à l'interaction entre INO et NOZZLE (NZZ) (Sieber et al., 2004). Cependant il n'est pas nécessaire à cette interaction puisque le domaine à doigt de zinc est également suffisant à l'interaction entre INO et NZZ (Sieber et al., 2004). Chez les mammifères, les protéines contenant un domaine doigt de zinc C₂C₂ sont des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes cibles en se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, les éléments de réponse aux hormones (HREs) (Beato and Klug, 2000). Cependant, le rôle de ces deux domaines conservés chez CRC reste à déterminer.

Afin de mieux comprendre l'implication de CRC dans le développement du carpelle, l'équipe a, dans un premier temps, identifié des gènes cibles directes de CRC. Ce travail a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire et pour poursuivre cette étude, mon objectif a été d'identifier de potentielles interacteurs protéiques de CRC et de déterminer les domaines protéiques nécessaires à de possibles interactions protéiques et/ou à la liaison à l'ADN.

A- Interacteurs de CRABS CLAW

Trois des gènes YABBY sont exprimés dans le carpelle : *FIL*, *YAB3* et *CRC* (Bowman, 2000; Meister et al., 2005; Siegfried et al., 1999). Leurs patrons d'expression se chevauchent au niveau des zones abaxiales des futures valves (Bowman and Smyth, 1999; Siegfried et al., 1999). Ne connaissant à ce jour aucun interacteur de CRC et afin de tester une éventuelle interaction de ces protéines YABBY entre elles, j'ai utilisé la technique de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC : "Bimolecular Fluorescence Complementation"), permettant de visualiser des interactions *in planta*. De plus, une équipe du laboratoire ayant identifié CRABS CLAW comme interacteur protéique putatif de LEUNIG_HOMOLOG (LUH) grâce à une expérience de double hybride, j'ai également testé l'interaction *in planta* de CRC avec LUH. Le mutant *luh* développe des fleurs normales, cependant dans un fond mutant *lug* lorsqu'une copie du gène *LUH* (*luh+/-*) est mutée le phénotype floral du mutant *lug* est aggravé (Sitaraman et al., 2008). Ce phénotype suggère que *LUH* a un rôle dans le développement floral. Pour chaque protéine à tester, on fusionne

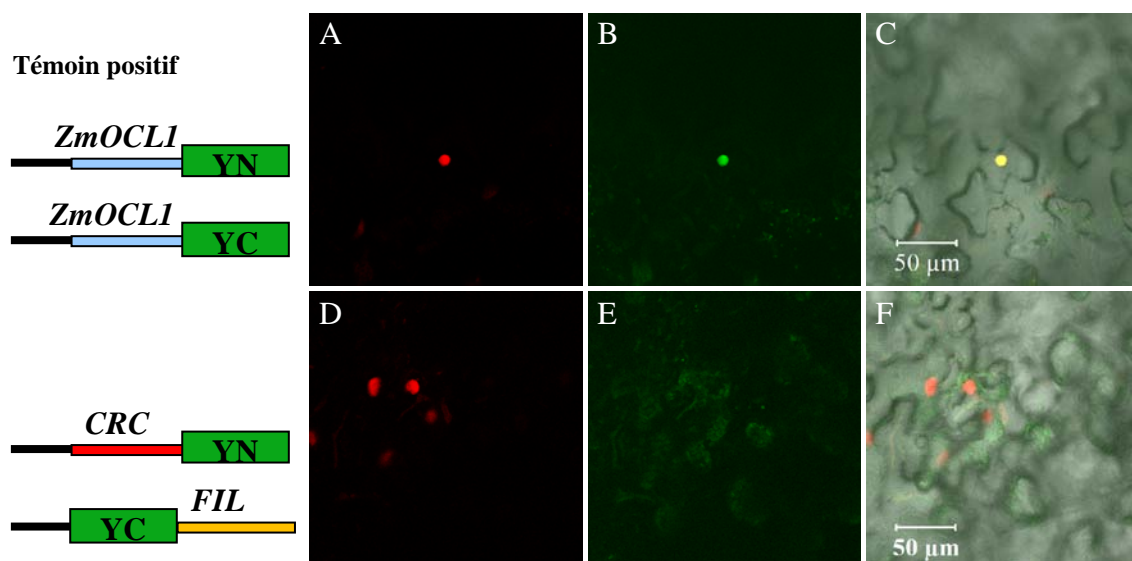


Figure III-2 : Test d'interaction protéique entre protéines YABBY en BiFC.

A gauche, schéma des constructions testées en BiFC. A droite, images en microscopie confocale de cellules d'épiderme de feuilles de *Nicotiana benthamiana*. (A, D) La fluorescence rouge permet de localiser le noyau des cellules (pActine11::H2B-mRFP), (B, E) la fluorescence verte indique la reconstitution de la YFP provoquée par l'interaction des deux protéines testées et (C, F) La superposition des deux canaux de fluorescence. (C) La couleur jaune en C confirme l'homodimérisation de ZmOCL1 dans le noyau.

soit la partie C-terminale de la protéine fluorescente jaune : YFP (YC) soit la partie N-terminale de la YFP (YN) en amont ou en aval de la protéine d'intérêt. Cela fait donc quatre constructions pour chaque protéine à tester. Pour évaluer l'interaction entre deux protéines candidates, on teste donc seize combinaisons possibles. On utilise également une construction permettant de localiser le noyau des cellules. Cette construction code la protéine H2B (histone localisée dans le noyau) fusionnée à la protéine fluorescente rouge (RFP) sous le contrôle d'un promoteur fort (pActine11 ::H2B-mRFP). Des cellules d'épiderme de feuilles de tabac sont co-transformées transitoirement avec trois types de constructions : celle marquant le noyau des cellules et les deux constructions testant une interaction protéique (par exemple : YN-CRC et FIL-YC). On utilise en parallèle comme témoin positif, la protéine ZmOCL1 qui s'homodimérise dans le noyau (Depege-Fargeix et al., 2011). Les résultats sont présentés sur la figure III-2 et montrent que sur les feuilles transformées avec les constructions du témoin positif et le marqueur nucléaire, plusieurs cellules présentent un signal YFP qui co-localise avec le signal RFP (marqueur nucléaire). Aucun signal YFP n'est, en revanche, détectable pour l'interaction entre CRC et FIL. Pour *CRC*, *FIL* et *YAB3*, j'ai testé l'ensemble des combinaisons possibles alors que pour *CRC* et *LUH* j'ai uniquement testé les interactions avec les constructions LUH-YC et LUH-YN mais aucune combinaison n'a donné de signal positif. Au vue de ces résultats, nous avons pensé que si les interactions entre *CRC*, *FIL* et *YAB3* nécessitaient la présence d'un co-facteur peut être absent chez *Nicotiana benthamiana*, les mêmes expériences effectuées chez *Arabidopsis* seraient peut-être plus concluantes. J'ai donc renouvelé les expériences avec *CRC*, *FIL* et *YAB3* sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* (de nouveau, pour l'ensemble des combinaisons), mais malheureusement, je n'ai pu mettre en évidence aucune interaction (résultats non montrés).

B- La fonction des domaines protéiques de CRABS CLAW

Comme nous l'avons vu, les protéines de la famille YABBY sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés : un domaine à doigt de zinc C₂C₂ et un domaine HLH. Afin de connaître l'implication de ces domaines dans la liaison à l'ADN ou dans la formation d'éventuelles interactions protéiques, j'ai produit des plasmides contenant le gène *CRC* délété soit du domaine doigt de zinc, soit du domaine HLH. Ces plasmides ont été introduits dans des bactéries *E. coli* afin de produire les différentes protéines tronquées. Ce travail nous permettra par la suite, de tester la capacité de chaque protéine tronquée à se lier au promoteur

des gènes cibles direct de CRC, par exemple, *ARF4* et *ASI* (données de notre équipe non-publiées), et ainsi d'identifier le domaine de liaison à l'ADN de la protéine CRC. De la même façon, cela permettra, lorsque des interacteurs de CRC auront été identifiés, de mettre en évidence le ou les domaines de la protéine responsable des interactions protéine-protéine.

C- Motifs reconnus par la protéine CRABS CLAW

Si on émet l'hypothèse que le domaine HLH est impliqué dans la liaison à l'ADN, nous pouvons penser que le motif reconnu serait une E-box soit CANNTG (Ma et al., 1994). Parmi les séquences régulatrices des cibles directes de CRC identifiées dans l'équipe, le promoteur du gène *ARF4* comporte 18 E-box putatives, parmi lesquelles 38% comportent une adénine en troisième position et 50% une thymine en quatrième position. Dans le promoteur du gène *ASI*, on compte 23 E-box putatives, parmi lesquelles 39% se composent d'une adénine en troisième position et 43% d'une thymine en quatrième position. On obtient donc un résultat très similaire pour ces deux promoteurs. La E-box potentiellement reconnue par CRC pourrait donc être CAANTG ou CANTTG. Cependant, ces prédictions portent seulement sur 2 promoteurs et nécessitent donc d'être étayées par l'analyse d'autres promoteurs de gènes cible. Statistiquement, une séquence donnée de 5pb apparaît, aléatoirement, tous les 625pb (5^4). Les promoteurs des gènes *ARF4* et *ASI* comptent, respectivement, 5188pb avec 7 motifs CAANTG et 9 motifs CANTTG et 4806pb avec 9 motifs CAANTG et 10 motifs CANTTG. Pour *ARF4*, on obtient donc un motif CAANTG tous les 741pb et un motif CANTTG tous les 576pb; et pour *ASI*, on obtient un motif CAANTG tous les 534pb et un motif CANTTG tous les 480pb. On peut donc conclure à une petite sur-représentation du motif CANTTG pour les deux promoteurs et du motif CAANTG uniquement pour le promoteur d'*ASI*. Si on combine ces deux motifs, on obtient le motif CAATTG et la probabilité qu'une séquence de 6pb apparaisse, aléatoirement, est de un sur 1296pb ($1/6^4$). Ce motif de six acides aminés est présent trois fois sur le promoteur d'*ARF4* et six fois sur le promoteur d'*ASI* ce qui correspond à un motif tous les 1729pb pour *ARF4* et un motif tous les 801pb pour *ASI*. On obtient donc une sur-représentation de ce motif dans le promoteur d'*ASI* mais pas dans le promoteur d'*ARF4*. Il serait intéressant de muter ces boîtes dans le promoteur des gènes *ARF4* et *ASI* afin de vérifier si l'interaction entre CRC et le promoteur de ces gènes est abolie et donc si ce motif est essentiel à la liaison à l'ADN de CRC.

Pour conclure sur ce chapitre, je n'ai pas pu mettre en évidence d'interaction protéique entre CRC, FIL, YAB3 et LUH par la technique du BiFC sur feuille de tabac ni sur plantule d'*A. thaliana*. Ces résultats ne permettent pas de conclure que ces protéines n'interagissent pas. Il est possible que ces potentielles interactions ne soient pas identifiables par cette technique. En effet, suivant la conformation spatiale des protéines, chaque fragment du fluorophore peut-être plus ou moins accessible. De plus, le repliement de la protéine peut-être gêné par la présence du fluorophore ce qui peut empêcher une interaction protéique. D'autres techniques d'analyse des interactions protéiques sont envisageables, telles que la co-immunoprécipitation *in planta*, qui permet à la fois de s'affranchir de l'utilisation d'un fluorophore et de pallier à la présence éventuelle d'un co-facteur nécessaire à l'interaction entre CRC et ses interacteurs.

La poursuite de ce travail devrait permettre de mieux comprendre l'activité de CRC. Plus généralement en complément des données disponibles sur les gènes de la famille YABBY, il permettra, une meilleure connaissance de cette famille de gènes.

Conclusion et perspectives

Avant cette étude, nous savions que le gène *ETT* modifie la distribution apico-basale des différents tissus du gynécée. L'étude détaillée au microscope électronique à balayage du développement de carpelles mutants *ett* par Sessions a montré que la différenciation des valves chez les mutants *ett* a lieu sur une zone plus restreinte que chez le sauvage, suggérant un problème de mise en place des tissus plutôt qu'un problème de croissance (Sessions, 1997). L'étude détaillée des valves du gynécée mutant *ett-13* montre que la croissance cellulaire n'est pas modifiée alors que la taille des valves est réduite. Ces données confirment qu'*ETT* seul ne promeut pas la croissance cellulaire mais détermine la mise en place des tissus le long de l'axe apico-basal. Nous avons montré qu'*ETT* active la déméthylation des pectines et que la lignée sur-exprimant une PME1 mime le phénotype du mutant *ett*. Nos données suggèrent que la déméthylation des pectines serait responsable de la diminution de la taille des valves chez le mutant *ett*.

D'autre part, selon l'hypothèse de "Nemhauser", l'auxine agirait comme un morphogène au cours du développement du gynécée (Nemhauser et al., 2000). Ce que nous savons à l'heure actuelle c'est que l'auxine joue effectivement un rôle dans la mise en place des tissus le long de l'axe apico-basal du gynécée mais nous ne savons pas comment. On peut donc se demander si l'auxine agirait en amont des PME ou si son action dans le "patterning" du gynécée emprunterait une voie indépendante de la méthylation des pectines. Afin de mieux comprendre la relation entre l'auxine et le degré de méthylation des pectines lors de la morphogenèse du gynécée, on propose de réaliser des traitements au NPA sur des plantes sur-exprimant une PME. Si l'auxine agit en amont des PME alors on ne devrait pas observer de réduction des valves. A l'inverse si on observe une réduction des valves, on peut supposer que l'auxine n'agirait pas sur le degré de méthylation des pectines mais pourrait agir à d'autre niveau du remodelage de la paroi ou de sa synthèse. De plus, l'analyse comparative en FT-IR de la composition de la paroi de valves de gynécées sauvages traités ou non au NPA permettrait d'analyser l'implication de l'auxine dans le remodelage et la synthèse de la paroi. Toutefois, nous savons que le remodelage de la paroi fait intervenir de nombreuses enzymes et que les PME ne sont pas les uniques acteurs du remodelage de la paroi. De plus, on peut imaginer que le remodelage de la paroi n'est pas le seul paramètre permettant le développement des valves et que la synthèse de paroi est également nécessaire.

Pour conclure, ce travail a permis de révéler deux voies par lesquelles ETT contrôlerait la morphogénèse du gynécée, une voie impliquant la déméthylestérification des pectines et une autre voie a priori indépendante, où ETT activerait avec ARF4 la croissance cellulaire. Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur notre vision du mode de fonctionnement des facteurs de transcription ainsi que sur l'importance du rôle du remodelage de la paroi dans les processus de développement et de morphogénèse.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

A- Matériel végétal et conditions de culture

1- Matériel végétal

Les différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées au cours de mon travail de thèse sont présentées dans le tableau ci-dessous. J'ai également utilisé des plants de tabac *Nicotiana Benthiana* pour les expériences de BiFC.

Lignées	Gène affecté	Écotype	Provenance	Mutation ou insertion	Références
arf4-2 (SALK_070506)	At5g60450	Columbia Col-0	Salk institute	T-DNA	Hunter et al., 2006
BT2OE (SALK_148088)	At3g48360	Columbia Col-0	Salk institute	T-DNA	Ren et al., 2007
bt2-1 (SALK_002306C)	At3g48360	Columbia Col-0	Salk institute	T-DNA	Ren et al., 2007
ett-13 (SALK_040513)	At2g33860	Columbia Col-0	Salk institute	T-DNA	Pekker et al., 2005
ett-22 (SALK_052222)	At2g33860	Columbia Col-0	Salk institute	T-DNA	Pekker et al., 2005
iaa6-1	At1g52830	Wassilewskijia Ws-4	University of California	T-DNA	overvoorde et al, 2005
iaa17-6	At1g04250	Columbia Col-0	University of California	T-DNA	overvoorde et al, 2005
axr3-3	At1g04250	Columbia Col-0	University of York	Mutation ponctuelle (Diepoxybutane)	Pérez-Pérez et al, 2010
rdr6-15	At5g20320	Columbia Col-0	Oregon State University	T-DNA	Allen et al., 2004

Lignées	Gène affecté	Écotype	Provenance	Références
p35S::ETTmAB	At2g33860	Columbia Col-0	University of Pennsylvania	Fahlgren et al., 2006
p35S::ETT	At2g33860	Columbia Col-0	Réalisé au laboratoire	
PMEI3i	At5g20740	Columbia Col-0	INRA de Versailles	Peaucelle et al., 2008
PME5i	At5g47500	Columbia Col-0	INRA de Versailles	Peaucelle et al., 2008
p35S::DII-3xVenus-N7		Columbia Col-0	Réalisé au laboratoire	Brunoud et al., 2011
pDR5rev::3xVenus-N7		Columbia Col-0	California institute of technology	Heisler et al., 2005
p420::GUS	AT5G07420	Columbia Col-0	Université de Picardie	Louvet et al., 2006
p35S::ARF4-GR	At5g60450	Columbia Col-0	Réalisé au laboratoire	
p35S::ETT-GR	At2g33860	Columbia Col-0	Réalisé au laboratoire	

2- Milieux et conditions de culture

- Culture en terre

Les graines d'Arabidopsis semées sur terre sont cultivées sur du terreau en condition de jour long (jour : 18h à 20°C, nuit : 6h à 18°C) ou en jour continu à 16°C.

- Culture *in vitro*

L'ensemble des manipulations de culture *in vitro* sont réalisées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Les graines sont, dans un premier temps, stérilisées par 5 min d'incubation dans un mélange chlore éthanol (3,5g de chlore dissout dans 40ml d'eau millipore diluée au cinquantième dans de l'éthanol 96%). Après incubation, la solution est éliminée et les graines sont rincées trois fois avec de l'éthanol 96% puis séchées à l'air libre sous hotte toute la nuit. Les graines peuvent ensuite être semées sur milieu gélosé ou en milieu liquide. Le milieu gélosé est composé de MS (Duchefa, 4,3g/l) ; saccharose (10g/l) ; Plant-Agar (8g/l) ; pH 5,7 (KOH). Il est stérilisé par autoclavage puis est supplémenté ou non en antibiotiques. Pour la culture liquide, les graines sont immergées dans un milieu nutritif MS/2 (MS (Duchefa, 2,15g/l) ; glucose (5g/l) ; MES (0,5g/l) ; pH 5,7 (KOH)) et agitées à 200tour/mn. Le milieu nutritif est renouvelé après 7 jours de culture.

B- Croisements

Les croisements sont effectués sous la loupe binoculaire à l'aide de pinces fines. On sélectionne, sur la plante femelle, des bourgeons floraux tardifs mais clos, le pistil doit être à un stade de développement avancé sans que les anthères ne soient déhiscentes afin d'éviter les risques d'autofécondation. L'ensemble des pièces florales, excepté le pistil, sont éliminées des bourgeons sélectionnés. Sur le stigmate de ce pistil nu, on dépose le pollen provenant du parent mâle en frottant les étamines déhiscentes sur le stigmate. Les graines sont récoltées après maturation de la silique.

C- Traitement à l'auxine

Les plantules contenant la construction pDR5::VENUS sont immergées dans des bains contenant différentes concentrations d'auxine (3-indoleacetic acid de chez SIGMA) diluée dans un milieu nutritif MS/2 ((MS (Duchefa, 2,15g/l) ; glucose (5g/l) ; MES (0,5g/l) ; pH 5,7 (KOH)). Après 2 heures d'incubation, les plantules sont soit prélevées pour quantifier le niveau de transcrit VENUS, soit replacées en chambre de culture pour observer ultérieurement le patron d'expression de DR5 en microscopie confocale.

75

D- Préparation de la construction p35S::ARF4-GR

Pour préparer la construction d'intérêt, la technologie Gateway a été utilisée. Commercialisée par la société Invitrogen, la technologie *Gateway* s'appuie sur les propriétés de recombinaison homologue d'une enzyme de bactériophage au niveau des sites spécifiques *att*, utilisés naturellement pour l'intégration du bactériophage dans le génome d'*E. coli*. Ce mécanisme a été détourné pour en faire un système de recombinaison *in vitro*. Une recombinaison de LR Triple permet d'incorporer simultanément trois éléments dans un vecteur d'expression. Les vecteurs d'entrée contenant le promoteur 35S et la séquence codante de GR était disponible au laboratoire. J'ai donc amplifié par PCR la séquence codante du gène *ARF4* sans codon stop flanqué des 2 sites de recombinaison spécifique, *attB1* en amont, et *attB2* en aval.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
attB1-ARF4-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAATTTGACTTGAATACT
attB2-ARF4nostop-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAACCCCTAGTGATTGTAGGAGA

Les extensions *attB* sont encadrées en rouge.

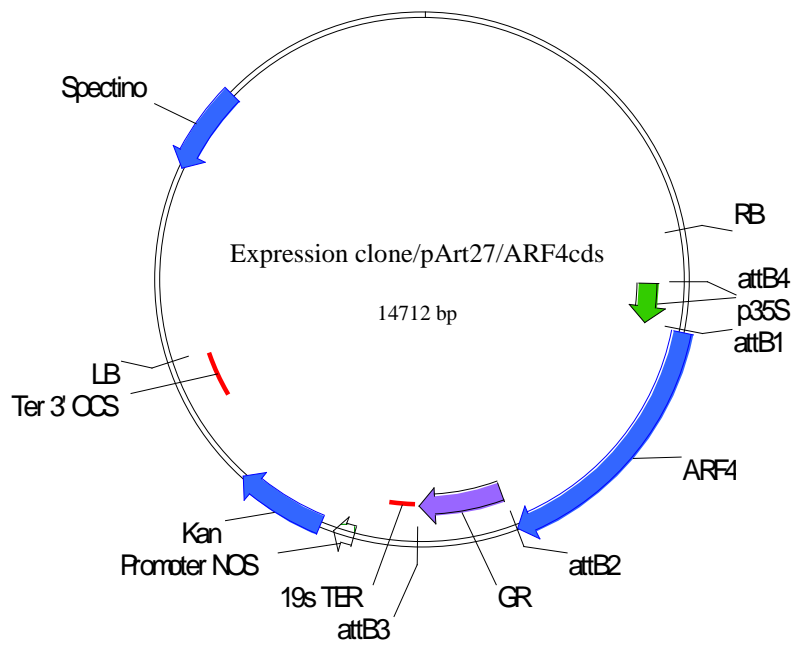


Figure IV-1 : Carte du vecteur permettant l'expression d'*ARF4* fusionné à GR sous le contrôle du promoteur fort p35S.

Par réaction de BP clonase, cet amplicon flanqué des sites *attB*, est inséré dans le vecteur donneur pDONR207 (Invitrogen) possédant les sites *attP1* et *attP2*. Grâce à cette recombinaison, le vecteur donneur est modifié et forme le vecteur d'entrée. Ce vecteur d'entrée contient les sites de recombinaison homologue *attL1* et *attL2* encadrant la séquence codante du gène ARF4. Par réaction de LR triple, les trois vecteurs d'entrée possédant les séquences d'intérêts (p35S, ARF4 et GR) recombinent avec le vecteur pArt27 pour former le vecteur d'expression possédant la construction *p35S::ARF4-GR* (Figure IV-1).

E- Transformation des plantes

La souche LBA 4404 d'*A. tumefaciens* a été utilisée pour la transformation des plantes. Des vecteurs binaires dérivés du plasmide pArt27 (Figure IV-1), portant le transgène à intégrer dans le génome de plantes, sont transférés dans *A. tumefaciens* à l'aide d'un électroporateur (Micropulser, Biorad). Pour chaque transformation de plante, un clone d'*A. tumefaciens* portant le plasmide d'intérêt est mis en culture dans un incubateur agitant à 28°C dans 20 ml de milieu LB contenant de la spectinomycine (100mg/ml). Cette pré-culture est ensuite utilisée pour inoculer 800 ml de LB- spectinomycine. Lorsque la densité optique de la culture atteint 1,6-1,8 (~18 heures plus tard), les bactéries sont centrifugées pendant 15 min à 5000 g, puis le culot est repris dans 800 ml de milieu d'infiltration (5% saccharose, 10 mM MgCl₂ et 0,01% Silwet (détergent)). Ce mélange est utilisé pour la transformation de plantes. Les inflorescences des plantes d'*A. thaliana* (Ecotype Col-0) sont immergées pendant 2 mn dans le milieu d'infiltration contenant la solution bactérienne. Les plantes ainsi traitées sont placées une nuit en atmosphère humide, puis cultivées en chambre de culture. Les graines issues de la première génération (T1) sont récoltées, puis semées sur un milieu gélosé MS supplémenté de kanamycine à 50mg/ml permettant de sélectionner les transformants, grâce à la présence du gène de résistance dans la construction. Les plantes résistantes sont repiquées en terre et placées en cellule. Ces plantes (T1) sont cultivées jusqu'à obtention des graines T2. A la génération T2, l'expression du transgène est vérifiée par RT-PCR. Les lignées présentant des insertions uniques sont sélectionnées grâce au gène de résistance par étude de la ségrégation du transgène. Enfin, les lignées homozygotes pour le transgène sont sélectionnées en génération T3.

F- Obtention de gènes tronqués par mutagenèse dirigée

A partir du plasmide pETM11 contenant la séquence codante du gène *CRC* (disponible au laboratoire), j'ai réalisé des PCR avec la polymérase Taq phusion high fidelity (Finnzymes) selon les instructions du fabricant. Les oligonucléotides sont dessinés de part et d'autre de la séquence à éliminer. Ils sont également phosphorylés à leur extrémité 5' pour permettre la ligation. Le produit PCR est purifié à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) puis élué dans 50µl d'eau. 20µl de l'éluât est digéré par l'enzyme DpnI (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. L'enzyme DpnI coupe uniquement l'ADN méthylé c'est-à-dire le plasmide de départ. Le produit de la digestion est déposé sur gel d'agarose. Après la migration, la bande correspondant au produit PCR est découpée puis le kit DNA Gel Extraction (Millipore) est utilisé pour extraire l'ADN du gel d'agarose. Estimer la quantité d'ADN, puis utiliser une quantité d'ADN inférieure à 200ng pour réaliser la ligation. La ligation s'effectue avec le kit Rapid DNA ligation (Roche) selon les instructions du fournisseur. Les plasmides obtenus sont utilisés pour transformer les bactéries *Escherichia coli* DH5α compétentes par choc thermique.

Nom	Séquence
CRC-S1	ACAACTCCTCCTTCAAGG
CRC-R1	GAGATGTTCTGGCTTGAGGGG
CRC-S2	CCTACTTCCATTACTTCCGG
CRC-R2	TTTGACGACAAAGGGAGGTG

G- Induction à la Dexaméthasone

Les inductions se font soit sur des inflorescences soit sur des plantules possédant les transgènes *p35S::ETT-GR* ou *p35S::ARF4-GR*. Les tissus à induire sont préalablement immergés deux minutes dans une solution de cycloheximide (10µM, inhibiteur de la traduction) contenant 0,1% de Tween20. Une heure après le traitement, les plantes sont traitées soit par une solution contenant de la cycloheximide (10µM), de la dexaméthasone (10µM) et 0,1% de Tween20, soit par une solution contenant de la cycloheximide (10µM), de l'éthanol (solvant de la dexaméthasone) et 0,1% de Tween20. Les échantillons sont récoltés deux heures après traitement et stockés à -80°C.

H- Extraction d'ARN

Les ARNs sont extraits d'inflorescences, de plantules ou de feuilles. Le broyage des échantillons est effectué dans des tubes eppendorf de 2ml contenant une bille d'acier avec l'appareil Rocky (fournisseur ?) pendant 30s à la température de l'azote liquide. Le broyat est rapidement replongé dans l'azote liquide puis les ARN sont extraits avec le kit Spectrum™ plant total RNA (Sigma-Aldrich®) en suivant les instructions du fournisseur. Le dosage des ARN est effectué avec un Nanodrop (Fournisseur). Les ARN sont stockés à -80°C.

I- RT-PCR quantitative

Les ARN totaux sont traités à la DNase selon les instructions du kit TURBO DNase free (Ambion). Les ADN complémentaire sont obtenus à partir de 4µg d'ARN à l'aide du kit RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas).

L'efficacité de chaque couple d'amorce a été calculée sur une gamme de dilution d'ADN complémentaire. Les amplifications en qPCR ont été réalisées avec le kit Fast SYBR Green Master Mix (Roche) sur la machine StepOnePlus™ selon les instructions donné par le fabricant (Applied Biosystems). Les gènes de référence utilisés sont GAPDH (GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase) et TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein). Ces gènes ont été sélectionnés à l'aide du logiciel BestKeeper. Chaque expérience a été réalisée en double avec des ARN issus de trois plantes différentes et deux répliques techniques ont été réalisées pour chaque réaction de PCR quantitative. Les valeurs de Ct (« cycle threshold » cycle à partir duquel la fluorescence est détectée) obtenues pour chaque couple en fonction du log de la concentration permet d'obtenir une droite de régression linéaire dont la pente est utilisée pour calculer l'efficacité (E) du couple d'amorce $E=10^{-1/\text{pente}}$. L'efficacité du couple doit être comprise entre 1,8 et 2,1. Afin de calculer le niveau d'expression relatif des gènes on utilise la méthode des $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). Les résultats sont normalisés par rapport aux gènes de références.

$$R = \frac{(\text{Efficacité}_{\text{gène cible}})^{\Delta Ct_{\text{gène cible (contrôle-échantillon)}}}}{(\text{Efficacité}_{\text{gène de référence}})^{\Delta Ct_{\text{gène de référence (contrôle-échantillon)}}}}$$

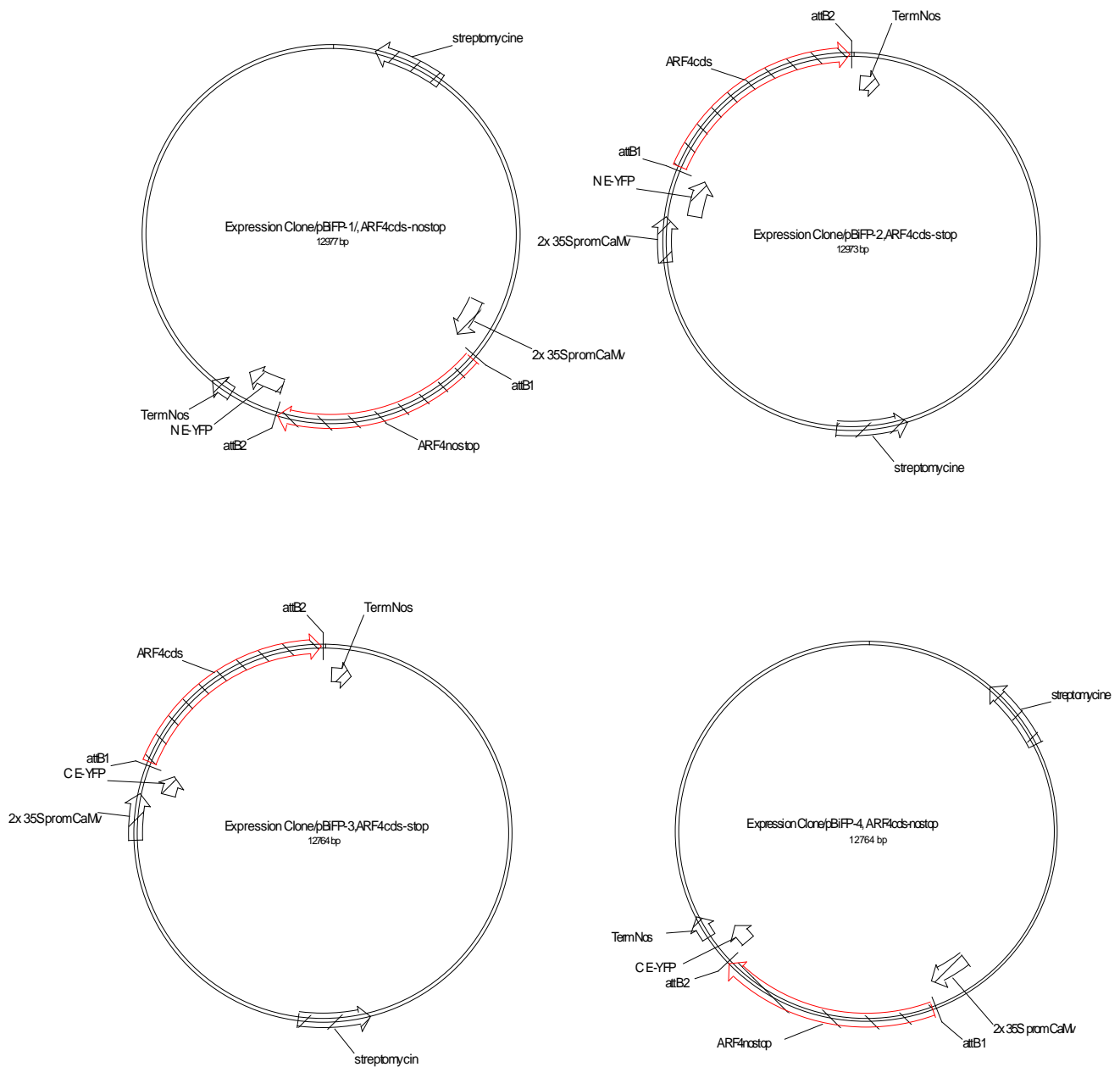


Figure IV-2 : Carte des vecteurs utilisés pour le BiFC exprimant la séquence codante d'*ARF4* fusionné avec soit la moitié N-terminale, soit la moitié C-terminale de la YFP sous le contrôle du promoteur fort p35S.

J- Complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC)

Cette technique est basée sur l'utilisation de deux fragments non-fluorescents de la YFP ("Yellow Fluorescent Protein") qui sont chacun fusionnés à une protéine candidate. La reconstitution de la fluorescence a lieu uniquement lorsque les deux fragments de la YFP sont réunis grâce à l'interaction entre les deux protéines candidates. Le BiFC a de nombreux avantages tels que l'absence de bruit de fond, une grande spécificité et une bonne stabilité du complexe ainsi formé. Les vecteurs d'expression du BiFC possèdent le fragment codant la partie C-terminale (YC) ou N-terminale (YN) de la YFP fusionnée soit en amont soit en aval de la séquence codante du gène d'intérêt (Figure IV-2). En effet, selon la conformation spatiale de la protéine chimère, les fragments de la YFP peuvent être plus ou moins accessibles. Il est donc nécessaire pour chaque protéine candidate, de produire quatre fusions différentes. Pour tester l'interaction entre deux protéines *in planta*, il faudra donc réaliser huit combinaisons.

Les séquences codantes sont amplifiées par PCR avec la polymérase Taq phusion high fidelity (Finnzymes) selon les instructions du fabricant à partir d'ADNc de l'écotype Columbia. Les séquences des amorces utilisées sont données dans le tableau en annexe. Les produits PCR sont clonés dans le vecteur pENTR/D/TOPO (Invitrogen). Les plasmides obtenus sont utilisés pour transformer les bactéries *Escherichia coli* DH5α compétentes par choc thermique. Les recombinants sont sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine (25mg/l). Les minipréparations de plasmides sont effectuées à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Les recombinaisons dans les vecteurs d'expression pBiFP (donné par F. Parcy, (Desprez et al., 2007)) sont réalisées grâce à la LR clonase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les vecteurs d'expressions sont introduits dans la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc électrique.

Le protocole d'agroinfiltration utilisé est décrit par Depege-Fargeix et ses collaborateurs (Depege-Fargeix et al., 2011).

K- Analyse de la composition de la paroi par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infra-rouge par l'échantillon analysé. Le spectromètre envoie sur l'échantillon un rayonnement infra-rouge et mesure les longueurs d'ondes réfléchies ou transmises par l'échantillon ainsi que les intensités d'absorption. Les longueurs d'ondes d'absorption sont

caractéristiques des groupements chimiques présents dans le tissu analysé. Les tissus, carpelles au stade 17 et plantules, sont préalablement fixés dans l'éthanol à 96%. La veille de l'analyse spectrométrique, les tissus sont réhydratés 5 minutes dans l'eau. Les valves sont séparées du carpelle à l'aide de pinces fines sous une loupe binoculaire et sont disposées entre lame et lamelle, placées dans un incubateur à 37°C et placées sous un objet lourd afin d'aplatir et de sécher les tissus durant une nuit. Les tissus sont ensuite placés entre deux pastilles de quartz, déposés dans un spectromètre Nexus ThermoNicolet puis analysés en mode transmission. L'analyse statistique des résultats obtenus est décrite par Mouille et ses collaborateurs (Mouille et al., 2003). Ces expériences ont été réalisées à l'INRA de Versailles en collaboration avec Grégory Mouille.

L- Hybridation *in situ*

Pour chaque gène étudié, la séquence codante pleine longueur a été utilisée comme sonde et la séquence codante de la GFP est systématiquement utilisée comme contrôle négatif. Les séquences sont amplifiées par PCR avec le kit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) en suivant les instructions du fournisseur. Les amorces utilisées pour amplifier les séquences codantes des gènes *ARF4*, *ETT* et de ses gènes cibles sont indiqués dans le tableau en annexe. La séquence correspondant au promoteur de l'ARN polymérase T7 a été rajoutée dans la séquence de l'amorce antiSens utilisée pour l'amplification PCR. Après purification des produits PCR sur colonne Nucleospin extract II (Macherey Nagel), 500ng d'ADN est utilisé comme matrice pour la réaction de transcription *in vitro*. Dans un volume final de 20 µl, sont ajoutés, 500ng d'ADN, 1 µl de tampon de transcription 5X (Promega, Madison, USA), 2 µl de "dig labelling mix" (Boehringer Mannheim, Allemagne), 10,5 µl d'eau traitée au DEPC (DiEthyl PyroCarbonate) qui inhibe l'activité des enzymes de type Rnase, 1 µl d'inhibiteur de RNase "Ribolock Ribonuclease Inhibitor" (Fermentas) et 1,5 µl d'ARN polymérase T7 (Promega). La réaction se déroule à 37°C pendant 45 min. Les nucléotides non incorporés sont éliminés par purification sur colonne "Quick spin columns for radiolabeled RNA purification" (Roche). Les ARN sont ensuite hydrolysés en fragments de 150 paires de bases par hydrolyse alcaline, puis précipités à l'éthanol et repris dans 50 µl de tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH7,5).

Pour la suite le protocole utilisé est celui de Ferrandiz et Sessions (Ferrandiz, 2002).

M- Immunolocalisation

L'immunolocalisation a été réalisée selon le protocole décrit par Heisler et ses collaborateurs (Heisler et al., 2010), excepté pour l'anticorps 2F4 où nous avons suivi le protocole décrit par Peaucelle et ses collaborateurs (Peaucelle et al., 2008).

REFERENCES

- Abel, S., Oeller, P.W., and Theologis, A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 326-330.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121, 207-221.
- Alvarez, J., and Smyth, D.R. (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* 126, 2377-2386.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-274.
- Bailly, A., Sovero, V., Vincenzetti, V., Santelia, D., Bartnik, D., Koenig, B.W., Mancuso, S., Martinoia, E., and Geisler, M. (2008). Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J Biol Chem* 283, 21817-21826.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* 22, 810-823.
- Bak, S., Nielsen, H.L., and Halkier, B.A. (1998). The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Mol Biol* 38, 725-734.
- Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W., and Feyereisen, R. (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 101-111.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M., and Ferrandiz, C. (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J Exp Bot* 57, 3457-3469.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., and Servillo, L. (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur J Biochem* 193, 183-187.
- Ballas, N., Wong, L.M., Ke, M., and Theologis, A. (1995). Two auxin-responsive domains interact positively to induce expression of the early indoleacetic acid-inducible gene PS-IAA4/5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3483-3487.
- Ballas, N., Wong, L.M., and Theologis, A. (1993). Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5, of pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 233, 580-596.
- Barley, K. (2004). Why hypocotyl extension mutants need to be characterized at the cell level: a case study of *axr3-1*. *J Exp Bot* 55, 1071-1078.
- Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Sandberg, G., and Bellini, C. (2000). The SUR2 gene of Arabidopsis thaliana encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14819-14824.
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., and Pellerin, P. (2001). Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58, 693-701.
- Bartel, B., and Fink, G.R. (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 268, 1745-1748.
- Beato, M., and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-236.
- Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A., and McQueen-Mason, S. (2005). Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J Exp Bot* 56, 817-823.

- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., and Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* 128, 4057-4067.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591-602.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950.
- Bennett, S.R., Alvarez, J., Bossinger, G. and Smyth, D. R. (1995). Morphogenesis in pinoid mutants of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 8, 505-520.
- Bosch, M., Cheung, A.Y., and Hepler, P.K. (2005). Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* 138, 1334-1346.
- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M.T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Hofte, H., and Truong, H.N. (2002). QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2577-2590.
- Bowman, J.L. (2000). The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Curr Opin Plant Biol* 3, 17-22.
- Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J., and Alvarez, J. (1999). Molecular genetics of gynoecium development in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol* 45, 155-205.
- Bowman, J.L., and Smyth, D.R. (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126, 2387-2396.
- Camardella, L., Carratore, V., Ciardiello, M.A., Servillo, L., Balestrieri, C., and Giovane, A. (2000). Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *Eur J Biochem* 267, 4561-4565.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3, 1-30.
- Chen, D., and Zhao, J. (2008). Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. *Physiol Plant* 134, 202-215.
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., and Masson, P.H. (1998). The arabidopsis thaliana AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15112-15117.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* 20, 1790-1799.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2430-2439.
- Cho, H.T., and Cosgrove, D.J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 3237-3253.
- Ciardiello, M.A., Tamburrini, M., Tuppo, L., Carratore, V., Giovane, A., Mattei, B., and Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: purification, characterization, and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *J Agric Food Chem* 52, 7700-7703.
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., and Hendrickson, A.M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8, 197-199.

Comai, L., and Kosuge, T. (1982). Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 149, 40-46.

Cooney, T.P., and Nonhebel, H.M. (1989). The measurement and mass spectral identification of indole-3-pyruvate from tomato shoots. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 761-766.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850-861.

Cox, D.N., and Muday, G.K. (1994). NPA binding activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* 6, 1941-1953.

D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T.M., Giovane, A., and Servillo, L. (2003). Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins* 53, 830-839.

Davies, R.T., Goetz, D.H., Lasswell, J., Anderson, M.N., and Bartel, B. (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 365-376.

Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1984). Host-Pathogen Interactions : XXV. Endopolygalacturonic Acid Lyase from *Erwinia carotovora* Elicits Phytoalexin Accumulation by Releasing Plant Cell Wall Fragments. *Plant Physiol* 74, 52-60.

de Reuille, P.B., Bohn-Courseau, I., Ljung, K., Morin, H., Carraro, N., Godin, C., and Traas, J. (2006). Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1627-1632.

Dedeurwaerder, S., Menu-Bouaouiche, L., Mareck, A., Lerouge, P., and Guerineau, F. (2009). Activity of an atypical *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase. *Planta* 229, 311-321.

Depege-Fargeix, N., Javelle, M., Chambrier, P., Frangne, N., Gerentes, D., Perez, P., Rogowsky, P.M., and Vernoud, V. (2011). Functional characterization of the HD-ZIP IV transcription factor OCL1 from maize. *J Exp Bot* 62, 293-305.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Hofte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15572-15577.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 441-445.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9, 109-119.

Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., and Tsernoglou, D. (2005). Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell* 17, 849-858.

Domingo, C., Roberts, K., Stacey, N.J., Connerton, I., Ruiz-Teran, F., and McCann, M.C. (1998). A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *Plant J* 13, 17-28.

Dominguez-Puigjaner, E., I, L.L., Vendrell, M., and Prat, S. (1997). A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiol* 114, 1071-1076.

Dorokhov, Y.L., Skurat, E.V., Frolova, O.Y., Gasanova, T.V., Ivanov, P.A., Ravin, N.V., Skryabin, K.G., Makinen, K.M., Klimyuk, V.I., Gleba, Y.Y., *et al.* (2006). Role of the leader sequence in tobacco pectin methylesterase secretion. *FEBS Lett* 580, 3329-3334.

Eshed, Y., Baum, S.F., and Bowman, J.L. (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* 99, 199-209.

Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B., and Liscum, E. (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 236-241.

Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., and Deshaies, R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91, 221-230.

Ferguson, M.A., and Williams, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57, 285-320.

Ferrandiz C, F.C., Prunet N, Scutt CP, Sundberg E, Trehin C, Vialette-Guiraud AC (2010). Carpel development. In *Advances in Botanical Research*, pp. 1-73.

Ferrandiz, C.S., A. (2002). in *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, .

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.

Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., *et al.* (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306, 862-865.

Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226-2230.

Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., *et al.* (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44, 179-194.

Geshi, N., Jorgensen, B., and Ulvskov, P. (2004). Subcellular localization and topology of beta(1-->4)galactosyltransferase that elongates beta(1-->4)galactan side chains in rhamnogalacturonan I in potato. *Planta* 218, 862-868.

Giovane, A., Balestrieri, C., Quagliuolo, L., Castaldo, D., and Servillo, L. (1995). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit. Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. *Eur J Biochem* 233, 926-929.

Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M.A., and Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1696, 245-252.

Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., and Halkier, B.A. (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8245-8250.

Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 1555-1573.

Goubet, F., and Mohnen, D. (1999). Solubilization and partial characterization of homogalacturonan-methyltransferase from microsomal membranes of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 121, 281-290.

Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., and Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 13, 1678-1691.

Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.

Guilfoyle, T.J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10, 453-460.

Halkier, B.A., and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57, 303-333.

Hamant, O., Traas, J., and Boudaoud, A. (2010). Regulation of shape and patterning in plant development. *Curr Opin Genet Dev* 20, 454-459.

Hardtke, C.S., and Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* 17, 1405-1411.

Heisler, M.G., Hamant, O., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Ohno, C., Jonsson, H., Traas, J., and Meyerowitz, E.M. (2010). Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS Biol* 8, e1000516.

Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* 15, 1899-1911.

Hellmann, H., Hobbie, L., Chapman, A., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., del Pozo, C., Reinhardt, D., and Estelle, M. (2003). Arabidopsis AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *EMBO J* 22, 3314-3325.

Hewezi, T., Howe, P., Maier, T.R., Hussey, R.S., Mitchum, M.G., Davis, E.L., and Baum, T.J. (2008). Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with Arabidopsis pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism. *Plant Cell* 20, 3080-3093.

Hothorn, M., D'Angelo, I., Marquez, J.A., Greiner, S., and Scheffzek, K. (2004a). The invertase inhibitor Nt-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. *J Mol Biol* 335, 987-995.

Hothorn, M., Wolf, S., Aloy, P., Greiner, S., and Scheffzek, K. (2004b). Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell* 16, 3437-3447.

Hull, A.K., Vij, R., and Celenza, J.L. (2000). Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2379-2384.

Hunter, C., Willmann, M.R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M., and Poethig, S.R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* 133, 2973-2981.

Ishii, T. (1997). O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol* 113, 1265-1272.

Ishimaru, M., Smith, D.L., Gross, K.C., and Kobayashi, S. (2007). Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. *J Plant Physiol* 164, 1675-1682.

Jackson, R.G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., and Bowles, D.J. (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* 32, 573-583.

Jimenez-Bermudez, S., Redondo-Nevado, J., Munoz-Blanco, J., Caballero, J.L., Lopez-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., and Mercado, J.A. (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128, 751-759.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jornvall, H., Markovic, O., and Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Lett* 514, 243-249.

Kai, K., Horita, J., Wakasa, K., and Miyagawa, H. (2007). Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* 68, 1651-1663.

Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., *et al.* (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284, 657-661.

Kanaya, E., Nakajima, N., and Okada, K. (2002). Non-sequence-specific DNA binding by the FILAMENTOUS FLOWER protein from *Arabidopsis thaliana* is reduced by EDTA. *J Biol Chem* 277, 11957-11964.

Kang, S., Kang, K., Lee, K., and Back, K. (2007). Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. *Planta* 227, 263-272.

Kapulnik, Y., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Kaplan, Y., Wininger, S., Hershenhorn, J., and Koltai, H. (2011). Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 62, 2915-2924.

Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H.T., Cosgrove, D., Fleming, A., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J., *et al.* (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol* 55, 311-314.

Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446-451.

Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11786-11791.

Kim, J.I., Sharkhuu, A., Jin, J.B., Li, P., Jeong, J.C., Baek, D., Lee, S.Y., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S., Bohnert, H.J., *et al.* (2007). *yucca6*, a dominant mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol* 145, 722-735.

Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1990). PECTIN ESTERIFICATION IS SPATIALLY REGULATED BOTH WITHIN CELL-WALLS AND BETWEEN DEVELOPING-TISSUES OF ROOT APICES. *Planta* 181, 512-521.

Kosuge, T., Heskett, M.G., and Wilson, E.E. (1966). Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi*. *J Biol Chem* 241, 3738-3744.

Kowalczyk, M., and Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127, 1845-1853.

Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., and Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol* 47, 788-792.

Lee, D.K., Ahn, J.H., Song, S.K., Choi, Y.D., and Lee, J.S. (2003). Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol* 131, 985-997.

Lehner, A., Dardelle, F., Soret-Morvan, O., Lerouge, P., Driouich, A., and Mollet, J.C. (2010). Pectins in the cell wall of *Arabidopsis thaliana* pollen tube and pistil. *Plant Signal Behav* 5, 1282-1285.

Levitin, B., Richter, D., Markovich, I., and Zik, M. (2008). Arabinogalactan proteins 6 and 11 are required for stamen and pollen function in *Arabidopsis*. *Plant J* 56, 351-363.

Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (1996). Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* 10, 403-413.

Li, M., Xu, W., Yang, W., Kong, Z., and Xue, Y. (2007). Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma in rice. *Plant Physiol* 144, 1797-1812.

Li, Y., Liu, D., Tu, L., Zhang, X., Wang, L., Zhu, L., Tan, J., and Deng, F. (2010). Suppression of GhAGP4 gene expression repressed the initiation and elongation of cotton fiber. *Plant Cell Rep* 29, 193-202.

Liners, F., Letesson, J.J., Didembourg, C., and Van Cutsem, P. (1989). Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *Plant Physiol* 91, 1419-1424.

- Liscum, E., and Reed, J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 49, 387-400.
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* 6, 645-657.
- Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guenin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F., and Pelloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224, 782-791.
- Ludwig-Muller, J., Vertocnik, A., and Town, C.D. (2005a). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J Exp Bot* 56, 2095-2105.
- Ludwig-Muller, J., Walz, A., Slovin, J.P., Epstein, E., Cohen, J.D., Dong, W.Q., and Town, C.D. (2005b). Overexpression of maize IAGLU in *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and sensitivity to IAA but not IBA and 2,4-D. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 127-141.
- Luschnig, C. (2001). Auxin transport: why plants like to think BIG. *Curr Biol* 11, R831-833.
- Luschnig, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., and Fink, G.R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 12, 2175-2187.
- Lynch, M.A., and Staehelin, L.A. (1992). Domain-specific and cell type-specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J Cell Biol* 118, 467-479.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Mandadi, K.K., Misra, A., Ren, S., and McKnight, T.D. (2009). BT2, a BTB protein, mediates multiple responses to nutrients, stresses, and hormones in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 150, 1930-1939.
- Maraschin Fdos, S., Memelink, J., and Offringa, R. (2009). Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* 59, 100-109.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 14, 589-597.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D., and Maizel, A. (2010). miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22, 1104-1117.
- Markovic, O., and Jornvall, H. (1992). Disulfide bridges in tomato pectinesterase: variations from pectinesterases of other species; conservation of possible active site segments. *Protein Sci* 1, 1288-1292.
- McClung, C.R. (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 792-803.
- McKenna, B.A., Nicholson, T.M., Wehr, J.B., and Menzies, N.W. (2010). Effects of Ca, Cu, Al and La on pectin gel strength: implications for plant cell walls. *Carbohydr Res* 345, 1174-1179.
- McQueen-Mason, S., and Cosgrove, D.J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6574-6578.
- McQueen-Mason, S.J., and Cosgrove, D.J. (1995). Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol* 107, 87-100.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L., and Munoz-Blanco, J. (1997). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific

cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol Biol* 34, 867-877.

Meister, R.J., Oldenhof, H., Bowman, J.L., and Gasser, C.S. (2005). Multiple protein regions contribute to differential activities of YABBY proteins in reproductive development. *Plant Physiol* 137, 651-662.

Miao, Y., Li, H.Y., Shen, J., Wang, J., and Jiang, L. (2011). QUASIMODO 3 (QUA3) is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in Arabidopsis suspension-cultured cells. *J Exp Bot*.

Milani, P., Gholamirad, M., Traas, J., Arneodo, A., Boudaoud, A., Argoul, F., and Hamant, O. (2011). In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. *Plant J* 67, 1116-1123.

Mitchell, C.L., and Harley, V.R. (2002). Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Mol Genet Metab* 77, 217-225.

Moore, P.J., Swords, K.M., Lynch, M.A., and Staehelin, L.A. (1991). Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J Cell Biol* 112, 589-602.

Mouille, G., Ralet, M.C., Cavelier, C., Eland, C., Effroy, D., Hematy, K., McCartney, L., Truong, H.N., Gaudon, V., Thibault, J.F., *et al.* (2007). Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J* 50, 605-614.

Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., and Hofte, H. (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J* 35, 393-404.

Moustacas, A.M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., and Ricard, J. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem J* 279 (Pt 2), 351-354.

Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., *et al.* (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 459, 1136-1140.

Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J* 17, 6903-6911.

Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., and Glazebrook, J. (2007). Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* 19, 2039-2052.

Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., *et al.* (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132, 4107-4118.

Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M., and Reed, J.W. (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol* 123, 563-574.

Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M., and Ricard, J. (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur J Biochem* 155, 199-202.

Nemhauser, J.L., Feldman, L.J., and Zambryski, P.C. (2000). Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* 127, 3877-3888.

Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.

- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., *et al.* (2007). Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J Exp Bot* 58, 1281-1290.
- Noh, B., Murphy, A.S., and Spalding, E.P. (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 13, 2441-2454.
- Normanly, J., Cohen, J.D., and Fink, G.R. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10355-10359.
- Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G.R., and Bartel, B. (1997). *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *Plant Cell* 9, 1781-1790.
- Nunan, K.J., and Scheller, H.V. (2003). Solubilization of an arabinan arabinosyltransferase activity from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 132, 331-342.
- Ohta, T., Michel, J.J., Schottelius, A.J., and Xiong, Y. (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 3, 535-541.
- Okada, K., and Shimura, Y. (1990). REVERSIBLE ROOT-TIP ROTATION IN ARABIDOPSIS SEEDLINGS INDUCED BY OBSTACLE-TOUCHING STIMULUS. *Science* 250, 274-276.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of *Arabidopsis* Floral Bud Formation. *Plant Cell* 3, 677-684.
- Ostin, A., Ilic, N., and Cohen, J.D. (1999). An in vitro system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 119, 173-178.
- Ostin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118, 285-296.
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J., and Theologis, A. (2001). IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* 13, 829-841.
- Ouyang, J., Shao, X., and Li, J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 24, 327-333.
- Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., *et al.* (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17, 3282-3300.
- Palusa, S.G., Golovkin, M., Shin, S.B., Richardson, D.N., and Reddy, A.S. (2007). Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in *Arabidopsis*. *New Phytol* 174, 537-550.
- Park, M.H., Suzuki, Y., Chono, M., Knox, J.P., and Yamaguchi, I. (2003). CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiol* 131, 1450-1459.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant J* 25, 399-406.
- Peaucelle, A., Louvet, R., Johansen, J.N., Hofte, H., Laufs, P., Pelloux, J., and Mouille, G. (2008). *Arabidopsis* phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr Biol* 18, 1943-1948.
- Pekker, I., Alvarez, J.P., and Eshed, Y. (2005). Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* 17, 2899-2910.

Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405, 200-203.

Pereira, L.G., Coimbra, S., Oliveira, H., Monteiro, L., and Sottomayor, M. (2006). Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 223, 374-380.

Perez-Perez, J.M., Candela, H., Robles, P., Lopez-Torrejón, G., del Pozo, J.C., and Micol, J.L. (2010). A role for AUXIN RESISTANT3 in the coordination of leaf growth. *Plant Cell Physiol* 51, 1661-1673.

Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., *et al.* (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312, 914-918.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Pflüger, J., and Zambryski, P. (2004). The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* 131, 4697-4707.

Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C., and Fleming, A. (2001). Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11812-11817.

Pollmann, S., Duchting, P., and Weiler, E.W. (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70, 523-531.

Powell, J.T., and Brew, K. (1974). Glycosyltransferases in the Golgi membranes of onion stem. *Biochem J* 142, 203-209.

Przemeck, G.K., Mattsson, J., Hardtke, C.S., Sung, Z.R., and Berleth, T. (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200, 229-237.

Radwanski, E.R., and Last, R.L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7, 921-934.

Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F., and Bellincampi, D. (2004). Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett* 557, 199-203.

Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O., and Callis, J. (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* 13, 2349-2360.

Raven, J.A. (1975). TRANSPORT OF INDOLEACETIC-ACID IN PLANT-CELLS IN RELATION TO PH AND ELECTRICAL POTENTIAL GRADIENTS, AND ITS SIGNIFICANCE FOR POLAR IAA TRANSPORT. *New Phytologist* 74, 163-172.

Ray, J., Knapp, J., Grierson, D., Bird, C., and Schuch, W. (1988). Identification and sequence determination of a cDNA clone for tomato pectin esterase. *Eur J Biochem* 174, 119-124.

Robert, H.S., Quint, A., Brand, D., Vivian-Smith, A., and Offringa, R. (2008). BTB AND TAZ DOMAIN scaffold proteins perform a crucial function in *Arabidopsis* development. *Plant J.*

Romano, C.P., Robson, P.R., Smith, H., Estelle, M., and Klee, H. (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Mol Biol* 27, 1071-1083.

Ross, H.A., Wright, K.M., McDougall, G.J., Roberts, A.G., Chapman, S.N., Morris, W.L., Hancock, R.D., Stewart, D., Tucker, G.A., James, E.K., *et al.* (2011). Potato tuber pectin structure is influenced by pectin methyl esterase activity and impacts on cooked potato texture. *J Exp Bot* 62, 371-381.

Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., and Leyser, O. (1998). Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. *Science* 279, 1371-1373.

Rubery, P.H., and Sheldrake, A.R. (1974). CARRIER-MEDIATED AUXIN TRANSPORT. *Planta* 118, 101-121.

Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev* 12, 198-207.

Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Duchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E., and Geisler, M. (2005). MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett* 579, 5399-5406.

Santiago-Domenech, N., Jimenez-Bemudez, S., Matas, A.J., Rose, J.K., Munoz-Blanco, J., Mercado, J.A., and Quesada, M.A. (2008). Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J Exp Bot* 59, 2769-2779.

Sarojram, R., Sappl, P.G., Goldshmidt, A., Efroni, I., Floyd, S.K., Eshed, Y., and Bowman, J.L. (2010). Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities. *Plant Cell* 22, 2113-2130.

Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., and Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214, 821-828.

Seol, J.H., Feldman, R.M., Zachariae, W., Shevchenko, A., Correll, C.C., Lyapina, S., Chi, Y., Galova, M., Claypool, J., Sandmeyer, S., *et al.* (1999). Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* 13, 1614-1626.

Sessions, A., Nemhauser, J.L., McColl, A., Roe, J.L., Feldmann, K.A., and Zambryski, P.C. (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* 124, 4481-4491.

Sessions, R. (1997). Arabidopsis (Brassicaceae) flower development and gynoecium patterning in wild type and Etti mutants. *Am J Bot* 84, 1179.

Sessions, R.A., and Zambryski, P.C. (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild and in etti mutants. *Development* 121, 1519-1532.

Sieber, P., Petrascheck, M., Barberis, A., and Schneitz, K. (2004). Organ polarity in Arabidopsis. NOZZLE physically interacts with members of the YABBY family. *Plant Physiol* 135, 2172-2185.

Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N., and Bowman, J.L. (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* 126, 4117-4128.

Sitaraman, J., Bui, M., and Liu, Z. (2008). LEUNIG_HOMOLOG and LEUNIG perform partially redundant functions during Arabidopsis embryo and floral development. *Plant Physiol* 147, 672-681.

Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2, 755-767.

Staswick, P.E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol* 150, 1310-1321.

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiriyaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., and Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17, 616-627.

Staswick, P.E., Tiriyaki, I., and Rowe, M.L. (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14, 1405-1415.

Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G., and Alonso, J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* *133*, 177-191.

Sterling, J.D., Quigley, H.F., Orellana, A., and Mohnen, D. (2001). The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol* *127*, 360-371.

Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., and Kasahara, H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 5430-5435.

Sun, L., and van Nocker, S. (2010). Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* *10*, 152.

Sun, W., Kieliszewski, M.J., and Showalter, A.M. (2004). Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant J* *40*, 870-881.

Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., *et al.* (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* *10*, 946-954.

Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev* *15*, 2648-2653.

Tan, P., Fuchs, S.Y., Chen, A., Wu, K., Gomez, C., Ronai, Z., and Pan, Z.Q. (1999). Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* *3*, 527-533.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* *446*, 640-645.

Tanimoto, M., Jowett, J., Stirnberg, P., Rouse, D., and Leyser, O. (2007). pax1-1 partially suppresses gain-of-function mutations in Arabidopsis AXR3/IAA17. *BMC Plant Biol* *7*, 20.

Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., *et al.* (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* *133*, 164-176.

Terasaka, K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., *et al.* (2005). PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell* *17*, 2922-2939.

Tian, G.W., Chen, M.H., Zaltsman, A., and Citovsky, V. (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev Biol* *294*, 83-91.

Tian, Q., and Reed, J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* *126*, 711-721.

Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* *15*, 533-543.

Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* *16*, 533-543.

Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* *13*, 2809-2822.

Tobena-Santamaria, R., Bliet, M., Ljung, K., Sandberg, G., Mol, J.N., Souer, E., and Koes, R. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes Dev* *16*, 753-763.

Tsang, D.L., Edmond, C., Harrington, J.L., and Nuhse, T.S. (2011). Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway. *Plant Physiol* 156, 596-604.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997a). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-1868.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999a). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5844-5849.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999b). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* 19, 309-319.

Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611-1623.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.

Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (1998). Agr, an Agravitropic locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane-protein family member. *Plant Cell Physiol* 39, 1111-1118.

Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., *et al.* (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* 7, 508.

Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., *et al.* (2008). Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* 13, 151-159.

Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C., and Somerville, S.C. (2002). PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2095-2106.

Volpi, C., Janni, M., Lionetti, V., Bellincampi, D., Favaron, F., and D'Ovidio, R. (2011). The ectopic expression of a pectin methyl esterase inhibitor increases pectin methyl esterification and limits fungal diseases in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 1012-1019.

Walz, A., Seidel, C., Rusak, G., Park, S., Cohen, J.D., and Ludwig-Muller, J. (2008). Heterologous expression of IAP1, a seed protein from bean modified by indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *Planta* 227, 1047-1061.

Wang, J.W., Wang, L.J., Mao, Y.B., Cai, W.J., Xue, H.W., and Chen, X.Y. (2005). Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2204-2216.

Whitney, S.E., Gidley, M.J., and McQueen-Mason, S.J. (2000). Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J* 22, 327-334.

Williams, L., Carles, C.C., Osmont, K.S., and Fletcher, J.C. (2005). A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9703-9708.

Wing, R.A., Yamaguchi, J., Larabell, S.K., Ursin, V.M., and McCormick, S. (1990). Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol Biol* 14, 17-28.

Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T., and Greiner, S. (2003). Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 555, 551-555.

Wolf, S., Rausch, T., and Greiner, S. (2009). The N-terminal pro region mediates retention of unprocessed type-I PME in the Golgi apparatus. *Plant J* 58, 361-375.

Wright, A.D., Sampson, M.B., Neuffer, M.G., Michalczyk, L., Slovin, J.P., and Cohen, J.D. (1991). Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in the Mutant Maize orange pericarp, a Tryptophan Auxotroph. *Science* 254, 998-1000.

- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M.J., Jensen, P.J., and Estelle, M. (2009). The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol* 151, 168-179.
- Yang, J., Sardar, H.S., McGovern, K.R., Zhang, Y., and Showalter, A.M. (2007). A lysine-rich arabinogalactan protein in Arabidopsis is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant J* 49, 629-640.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., and Nielsen, E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol* 16, 1123-1127.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., and Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35-39.
- Yoon, E.K., Yang, J.H., Lim, J., Kim, S.H., Kim, S.K., and Lee, W.S. (2010). Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. *Nucleic Acids Res* 38, 1382-1391.
- Zabackis, E., Huang, J., Muller, B., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1995). Characterization of the cell-wall polysaccharides of Arabidopsis thaliana leaves. *Plant Physiol* 107, 1129-1138.
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., and Callis, J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11795-11800.
- Zhang, G.F., and Staehelin, L.A. (1992). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells : immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol* 99, 1070-1083.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291, 306-309.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* 16, 3100-3112.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Supplemental data

Annexe 2 : Patron d'expression des gènes cible dans des coupes longitudinales d'inflorescences

Annexe 3 : Résultats des mesures du nombre et de la taille des organes floraux.

Annexe 4 : Aire des cellules des valves à partir d'image en microscopie électronique à balayage.

Annexe 5 : Expression des gènes *PIN* dans la plante d'*Arabidopsis*.

98

Annexe 6 : Liste des amorces utilisées en PCR quantitative.

Annexe 7 : Liste des amorces utilisées pour faire les sondes.

Annexe 8 : Liste des amorces utilisées pour le BiFC.

Annexe 1 : Supplemental data

Table S1: List of genes the expression of which is significantly changing upon ETT-GR induction.

Gene	Mean values			1st experiment			2nd experiment			3rd experiment		
	+ Dex	- Dex	ratio	pvalue	+ Dex	- Dex	ratio	pvalue	+ Dex	- Dex	ratio	pvalue
ATI069300 ATXPAL (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)	13.02	13.68	-0.67	1.14E-5	11.64	12.73	-1.09	0.00E+0	13.32	14.01	-0.69	5.62E-3
ATI0329140 Extensin family protein	10.36	10.98	-0.61	2.56E-4	9.89	10.75	-0.86	6.64E-7	10.17	10.50	-0.33	1.00E+0
ATI3601700 Arabinoxylanase (AGP11)	9.70	10.40	-0.70	2.05E-6	8.97	9.82	-0.85	1.01E-6	10.07	10.79	-0.72	1.73E-3
ATI0324105 Arabinoxylanase (AGP41)	10.07	10.75	-0.68	5.43E-6	8.83	9.51	-0.68	2.57E-3	10.17	11.03	-0.86	2.88E-6
ATI014420 Pectate lyase 3, AT159	8.48	9.06	-0.57	2.09E-3	7.45	7.98	-0.53	8.26E-1	8.96	9.74	-0.78	1.11E-4
ATI3601270 Pectate lyase 7	11.91	12.52	-0.62	1.49E-4	10.52	11.43	-0.91	3.00E-8	12.20	12.78	-0.58	3.98E-1
ATI5007420 PME	9.49	10.07	-0.58	1.39E-3	8.10	8.82	-0.72	4.60E-4	10.86	11.33	-0.47	1.00E+0
ATI3617060 PME	8.30	8.97	-0.67	1.02E-5	7.62	8.43	-0.81	6.71E-6	8.50	8.92	-0.42	1.00E+0
ATI010770 PME1	10.82	11.64	-0.82	3.82E-10	9.86	10.91	-1.05	5.60E-12	10.74	11.50	-0.76	3.03E-4
ATI2647030 PME1	11.29	12.00	-0.71	9.05E-7	10.43	11.25	-0.81	6.17E-6	11.32	12.01	-0.69	4.90E-3
ATI5030030 PME1	9.16	9.74	-0.59	1.12E-3	8.45	9.19	-0.74	2.24E-4	9.21	9.61	-0.40	1.00E+0
ATI2626450 PME1/PME	9.35	10.06	-0.72	5.40E-7	7.79	8.81	-1.02	5.04E-11	10.37	11.10	-0.73	1.09E-3
ATI5037870 PME1/PME	9.17	9.88	-0.72	5.66E-7	7.96	8.84	-0.99	4.54E-10	9.34	9.88	-0.54	1.00E+0
ATI004230 AXR3 (AUXIN RESISTANT 3), transcription factor, auxin-responsive protein/indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	8.70	9.32	-0.61	2.68E-4	8.07	8.88	-0.51	1.00E+0	9.27	10.00	-0.73	1.02E-3
ATI052830 IAA6, transcription factor, auxin-responsive protein/indoleacetic acid-induced protein 6 (IAA6)	9.40	10.02	-0.62	2.19E-4	9.19	10.09	-0.90	6.75E-8	10.13	10.79	-0.66	2.26E-2
ATI3648360 WRKY38; transcription factor	10.65	9.85	0.80	2.02E-9	10.66	9.16	1.50	0.00E+0	10.72	10.18	0.54	1.00E+0
ATI5032270 WRKY38; transcription factor WRKY38 are induced by salicylic acid	9.91	8.96	0.95	0.00E+0	8.91	7.84	1.07	0.00E+0	9.99	9.51	0.48	1.00E+0
ATI043160 ERF108 (ethylene response factor)	10.23	9.50	0.73	1.99E-7	9.66	8.87	0.79	1.71E-5	10.72	10.51	0.21	1.00E+0
ATI5002110 CYCD7-1, cyclin-dependent protein kinase	9.84	10.68	-0.84	1.18E-10	8.54	9.70	-1.15	0.00E+0	10.28	11.04	-0.76	3.23E-4
ATI5036710 glutamate-RNA ligase, putative / glutamyl-RNA synthetase, putative / OHS, putative, similar to OVARY ABORTION 9 / germ-line protein, putative	9.60	10.21	-0.61	2.40E-4	8.55	9.48	-0.93	1.43E-8	9.17	9.67	-0.49	1.00E+0
ATI031580 ECS1, cell wall protein	12.60	11.49	1.11	0.00E+0	11.61	10.54	1.07	0.00E+0	12.92	12.43	0.48	1.00E+0
ATI2039920 MLO1-2, calcium binding, seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 12 (MLO12)	11.99	12.62	-0.63	1.32E-4	10.69	11.23	-0.54	7.62E-1	12.00	12.57	-0.57	4.68E-1
ATI0303030 ATP phosphotransferase / copper ion binding / electron transporter / in arrose-1-phosphate glyoxylate oxidase (GDP) / protein-lysine-6-oxidase / transporter, sporozoite surface protein-related	8.35	9.00	-0.65	3.07E-5	6.79	6.84	-0.05	1.00E+0	9.05	9.96	-0.91	1.97E-7
ATI072260 TH12.1 (THIONIN 2.1), toxin receptor binding, thionin (TH12.1)	11.89	12.65	-0.76	3.34E-3	12.13	12.94	-0.81	7.80E-6	11.82	12.71	-0.89	5.73E-7
ATI4033010 BGAL1.1, beta-galactosidase / sugar binding, glycosyl hydrolase family 35 protein	10.04	10.88	-0.84	1.52E-10	9.47	10.43	-0.96	1.95E-9	9.78	10.90	-1.12	0.00E+0
ATI5003330 carboxylate binding, legume lectin family protein	11.38	10.55	0.83	2.02E-10	10.40	9.64	0.76	1.10E-4	11.62	11.02	0.60	1.47E-1
ATI019610 plant defensin-fusion protein (PDF1.4)	8.86	8.30	0.56	4.73E-3	8.15	7.16	1.00	2.52E-10	9.27	8.80	0.47	1.00E+0
ATI4012960 catalytic, gamma interferon responsive lysozyme, at thiol reductase family protein / GILT family protein	10.15	10.89	-0.74	9.13E-8	8.81	10.11	-1.30	0.00E+0	10.55	10.99	-0.45	1.00E+0
ATI2037040 ATP binding / protein kinase / protein serine/threonine kinase / protein-tyrosine kinase, leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	9.44	10.14	-0.69	2.30E-6	7.96	8.76	-0.80	1.03E-5	9.48	10.24	-0.77	2.25E-4
ATI5045930 carboxylic ester hydrolase / hydrolase, acting on ester bonds, GDSL-n-oligase / hydrolase family protein	9.52	10.14	-0.62	1.60E-4	8.69	9.50	-0.81	6.73E-6	8.93	9.41	-0.47	1.00E+0
ATI5041400 protein binding / ubiquitin-protein ligase / zinc finger, zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	9.37	10.19	-0.62	2.38E-4	8.81	9.56	-0.75	1.55E-4	10.06	10.61	-0.55	1.00E+0
ATI2031030 copper ion binding / electron transporter, plastocyanin-like domain-containing protein	7.72	8.31	-0.60	6.09E-4	6.90	7.07	-0.17	1.00E+0	9.06	10.66	-1.60	0.00E+0
ATI3038840 ice binding	10.97	11.57	-0.60	6.14E-4	9.81	10.75	-0.94	8.47E-9	11.47	11.92	-0.45	1.00E+0
ATI5004180 Carbonic anhydrase	9.14	9.71	-0.57	2.44E-3	8.13	8.88	-0.74	1.84E-4	9.25	9.81	-0.55	8.91E-1
ATI5033270 STP11 (SUGAR TRANSPORTER 11)	8.25	8.84	-0.59	1.02E-3	7.51	8.29	-0.78	3.08E-5	8.53	8.77	-0.24	1.00E+0
ATI2037180 aquaporin RD28	9.61	9.03	0.58	1.70E-3	9.61	8.51	1.10	0.00E+0	9.77	9.20	0.57	4.26E-1
ATI4035770 SEN1 (DARK INDUCIBLE 1), senescence-associated protein (SEN1)	11.66	10.87	0.78	6.40E-9	11.62	9.78	1.84	0.00E+0	12.08	11.48	0.59	2.15E-1
ATI061680 lysine, terpenase synthase / cyclase family protein	9.83	10.57	-0.73	1.79E-7	8.24	9.47	-1.22	0.00E+0	10.23	10.94	-0.71	2.54E-3
ATI5057010 calmodulin binding protein	11.21	11.90	-0.69	3.57E-6	10.72	11.22	-0.50	1.00E+0	11.10	12.14	-1.04	1.73E-10
ATI4002520 ATGSTF2, glutathione transferase	12.96	12.11	0.85	7.87E-11	13.17	11.29	1.88	0.00E+0	12.79	12.07	0.72	1.41E-3
ATI3035730 Calcium-dependent protein kinase 32 (CPK32)	9.96	10.62	-0.66	1.73E-5	10.41	11.14	-0.73	3.93E-4	11.05	11.48	-0.43	1.00E+0
ATI061860 ATP binding / kinase / protein kinase / protein serine/threonine kinase / protein-tyrosine kinase	9.02	9.68	-0.66	2.43E-5	7.76	8.37	-0.61	5.06E-2	9.37	10.27	-0.90	4.43E-7
ATI3051810 ATGM1, Em-like protein / GEA1 (EM1)	10.52	11.16	-0.63	8.24E-5	9.89	10.17	-0.28	1.00E+0	10.68	10.82	-0.14	1.00E+0
ATI015380 actoyglutathione lyase / la-cystiglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein	11.55	10.92	0.63	1.13E-4	12.39	10.61	1.78	0.00E+0	11.55	11.36	0.19	1.00E+0
ATI4036640 heat shock protein binding / unfolded protein binding_DNA heat shock N-terminal domain-containing protein (G11)	11.76	11.17	0.59	1.19E-3	11.08	10.27	0.82	5.59E-6	12.08	11.50	0.59	2.64E-1
ATI076370 ATP binding / kinase / protein kinase / protein serine/threonine kinase / protein-tyrosine kinase	8.54	9.12	-0.57	2.25E-3	7.59	8.33	-0.74	2.62E-4	8.91	9.37	-0.46	1.00E+0
ATI3030470 ERF-5, pseudogenes, glycine-rich protein	10.01	10.57	-0.57	2.74E-3	7.89	8.54	-0.65	1.16E-2	11.55	11.95	-0.40	1.00E+0
ATI4033090 CAT2 (CATALASE 2)	10.36	10.00	0.37	3.09E-3	10.02	9.41	0.61	4.87E-2	10.34	9.79	0.55	1.00E+0

Gene	Mean values			1st experiment			2nd experiment			3rd experiment		
	+Dex	-Dex	ratio	pvalue	+Dex	-Dex	ratio	pvalue	+Dex	-Dex	ratio	pvalue
SEC14_SEC14 cytosolic factor, putative / phosphoglyceride transfer protein, putative	8.28	8.84	-0.56	4.64E-3	7.53	7.96	-0.43	1.00E+0	8.53	9.25	-0.72	1.58E-3
AT4G39180 oxidoreductase, a dingo on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors_ oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	10.50	9.84	0.66	2.32E-5	9.83	9.19	0.64	1.91E-2	9.84	9.42	0.42	1.00E+0
AT5G24530 oxidoreductase, a dingo on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors_ oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	8.76	9.32	-0.56	4.70E-3	8.46	9.19	-0.73	3.49E-4	9.35	9.57	-0.22	1.00E+0
AT2G36690 ATP binding / protein kinase / protein serine/threonine kinase / protein-tyrosine kinase unknown protein / peritrophic peptide (PPR) repeat-containing protein	9.48	10.31	-0.83	2.53E-10	8.80	9.82	-1.02	6.17E-11	9.04	10.09	-1.04	1.29E-10
AT3G61160 photosystem II protein K	9.31	10.14	-0.83	1.80E-10	9.41	10.68	-1.27	0.00E+0	11.46	12.79	-1.33	0.00E+0
ATCG00070 ribosome L36	10.62	11.39	-0.77	2.03E-8	10.30	10.20	0.31	1.00E+0	11.90	13.60	-1.70	0.00E+0
ATCG00080 photosystem II protein L	10.91	11.60	-0.68	4.99E-6	11.45	12.67	-1.22	0.00E+0	13.06	13.70	-0.65	3.32E-2
ATCG00180 RNA polymerase subunit 1	7.72	8.43	-0.71	1.07E-6	6.30	6.55	-0.25	1.00E+0	8.97	11.04	-2.07	0.00E+0
ATCG00140 ATP synthase CF0 C chain	8.70	9.37	-0.68	6.91E-6	7.79	7.81	-0.01	1.00E+0	10.64	12.52	-1.88	0.00E+0
ATCG00770 ribosome alpha protein S8	9.10	9.76	-0.65	2.66E-5	8.91	8.61	0.30	1.00E+0	11.04	13.00	-1.97	0.00E+0
ATCG00480 ATP synthase CF1 beta chain	11.19	10.55	0.64	7.04E-5	10.94	10.72	0.22	1.00E+0	13.29	11.23	2.00	0.00E+0
ATCG00170 RNA polymerase subunit 2	11.47	10.84	0.63	1.15E-4	10.88	10.24	0.63	2.06E-2	12.59	10.93	1.66	0.00E+0
ATCG00140 ATP synthase CF0 C chain	8.51	9.14	-0.63	1.16E-4	7.28	7.29	0.00	1.00E+0	10.25	12.14	-1.90	0.00E+0
ATCG01070 NADH dehydrogenase subunit 4L	7.93	8.51	-0.58	1.60E-3	6.85	6.81	0.04	1.00E+0	9.34	11.05	-1.71	0.00E+0
ATCG00050 ribosome alpha protein S16	7.41	8.01	-0.61	3.75E-4	6.86	6.92	-0.06	1.00E+0	8.43	10.01	-1.58	0.00E+0
ATCG00480 ATP synthase CF1 beta chain / ATP synthase CF1 epsilon chain /	11.58	10.70	0.87	1.12E-11	11.62	11.33	0.28	1.00E+0	13.91	11.34	2.58	0.00E+0
ATCG00480 ATP synthase CF1 beta chain / ATP synthase CF1 epsilon chain /	12.47	11.73	0.74	1.10E-7	11.85	11.56	0.29	1.00E+0	13.59	11.26	2.33	0.00E+0
ATCG00760 ribosome L36 / ribosome alpha protein S11 /	12.30	12.93	-0.63	9.11E-5	12.76	12.46	0.29	1.00E+0	13.30	14.62	-1.32	0.00E+0
ATCG01070 NADH dehydrogenase subunit 4L / photosystem I subunit VIII /	7.89	8.48	-0.60	6.84E-4	6.87	6.86	0.01	1.00E+0	9.34	11.04	-1.70	0.00E+0
AT3G62230 unknown protein F-box family protein	9.21	10.21	-1.00	0.00E+0	7.96	9.15	-1.19	0.00E+0	9.96	11.12	-1.16	0.00E+0
AT3G28830 unknown protein	11.56	12.30	-0.75	8.48E-8	11.30	12.44	-1.13	0.00E+0	12.19	12.82	-0.63	5.47E-2
AT5G48430 unknown protein	8.29	8.92	-0.63	1.31E-4	7.62	8.12	-0.50	1.00E+0	8.36	9.27	-0.93	1.00E+0
AT5G39880 unknown protein	8.99	9.74	-0.75	6.25E-8	8.17	9.19	-1.02	5.60E-11	8.94	9.55	-0.61	1.11E-1
AT3G01240 unknown protein	10.84	11.41	-0.57	2.09E-3	9.07	9.73	-0.66	7.59E-3	11.11	11.78	-0.67	1.53E-2
AT5G61720 unknown protein	11.05	11.71	-0.66	1.67E-5	9.60	10.48	-0.89	1.44E-7	11.45	12.02	-0.57	4.57E-1
AT3G28750 unknown protein	11.46	12.23	-0.77	1.41E-8	10.89	11.99	-1.10	0.00E+0	11.36	11.87	-0.51	1.00E+0
AT5G24040 unknown protein, Bet v1 allergen family protein	9.79	10.83	-1.04	0.00E+0	8.99	10.05	-1.06	5.60E-12	9.98	10.40	-0.42	1.00E+0
AT1G35310 unknown protein, Bet v1 allergen family protein	10.47	11.13	-0.66	2.14E-5	9.28	10.61	-1.32	0.00E+0	10.40	10.88	-0.48	1.00E+0
AT4G13790 unknown protein, auxin-responsive protein, putative	11.29	11.96	-0.66	1.69E-5	10.83	11.71	-0.88	2.35E-7	11.08	11.64	-0.57	5.26E-1
unknown protein, pleckstrin homology (PH) domain-containing protein / lipid-binding START domain-containing protein	8.54	9.22	-0.68	5.07E-6	7.80	8.57	-0.77	5.52E-5	9.20	9.94	-0.74	7.00E-4
AT1G15330 unknown protein, CBS domain-containing protein	10.07	9.40	0.67	8.20E-6	10.44	9.00	1.45	0.00E+0	10.54	9.99	0.54	1.00E+0
AT2G25510 unknown protein	9.75	8.57	1.19	0.00E+0	7.79	7.00	0.80	1.35E-5	10.42	9.62	0.80	4.38E-5
AT2G33420 unknown protein	8.68	9.34	-0.66	1.88E-5	7.47	8.14	-0.67	4.57E-3	9.39	10.16	-0.77	2.24E-4
AT1G73870 unknown protein	9.28	10.03	-0.75	6.51E-8	7.90	9.02	-1.12	0.00E+0	9.69	10.24	-0.54	1.00E+0
AT1G10140 unknown protein	11.02	10.37	0.65	2.95E-5	10.94	9.26	1.68	0.00E+0	11.00	10.23	0.77	1.91E-4
AT4G21920 unknown protein	9.77	9.21	0.56	3.48E-3	9.74	8.05	1.69	0.00E+0	10.37	9.96	0.41	1.00E+0
AT4G18340 unknown protein	9.12	9.68	-0.56	3.82E-3	8.69	9.31	-0.62	4.03E-2	10.14	10.32	-0.17	1.00E+0
AT4G18340 unknown protein	8.48	9.06	-0.58	1.61E-3	7.61	8.04	-0.43	1.00E+0	9.10	9.60	-0.49	1.00E+0
AT3G04700 unknown protein	8.73	9.34	-0.61	2.72E-4	7.38	8.09	-0.72	5.96E-4	9.33	9.83	-0.50	1.00E+0
AT5G06015 unknown protein	8.71	9.33	-0.62	2.02E-4	8.06	8.83	-0.77	4.89E-5	7.86	8.16	-0.29	1.00E+0
AT1G64405 unknown protein	8.54	9.18	-0.64	5.08E-5	7.02	7.59	-0.57	2.09E-1	8.81	9.70	-0.89	7.81E-7
AT2G20670 unknown protein	11.29	10.61	0.69	3.24E-6	11.73	10.19	1.53	0.00E+0	10.72	10.11	0.60	1.47E-1
AT1G58120 unknown protein	9.17	9.92	-0.74	1.21E-7	7.79	8.79	-1.00	2.47E-10	9.53	10.06	-0.53	1.00E+0
AT4G18340 unknown protein	11.17	12.02	-0.84	8.99E-11	10.50	11.54	-1.04	1.12E-11	11.59	12.01	-0.42	1.00E+0

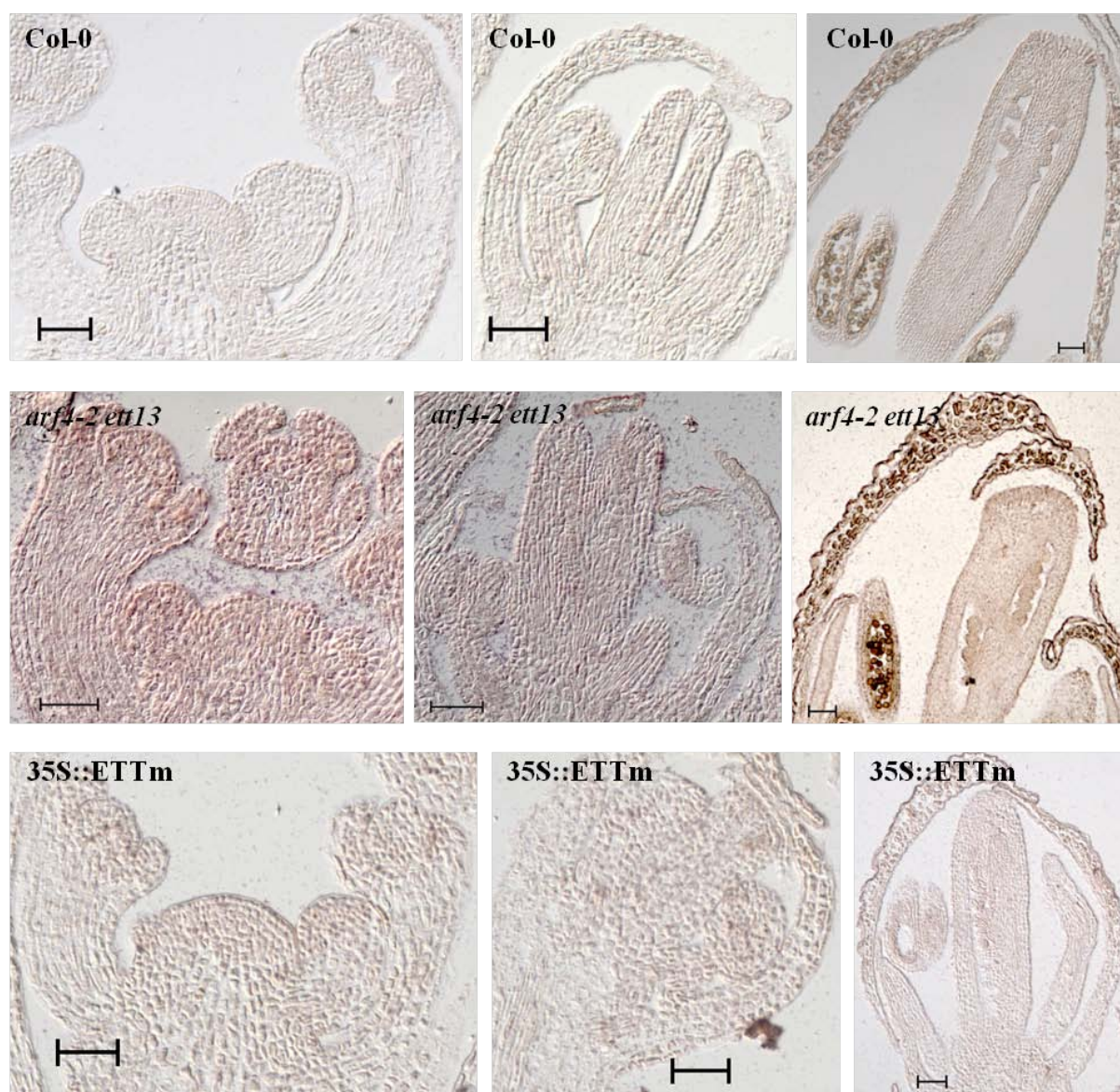
Table S2: List of primer pairs used for real-time PCR analyses.

Gene identifier	Gene abbreviation	Primer orientation	Sequence 5' to 3'
AT2G33860	ETT	Forward	TCTGTGTCTGTGGTGTCTTCG
		Reverse	ATGCCACAGCTCCAAACAA
AT3G26650	GAPDH	Forward	CGTTTCCATCGTCTCCTTCCAGACT
		Reverse	GTCCTCCCGATCCTACCGAATCC
AT1G69530	ATEXPA1	Forward	GGTCTTTCGGCCAGACCTTCACA
		Reverse	CAAGGCCTCGTGCAAAATCAAGC
AT1G29140	EXTENSIN	Forward	CCACATCAAGGGCTCCGTCTACTG
		Reverse	GGGTCACTGTCTGGTTCTCACGA
AT1G14420	PLL8	Forward	CGGCTCTTACGATCCTCATCCACTT
		Reverse	TGCTTTTGTGCGTTTTACGACCACT
AT3G01270	PLL10	Forward	TGCTGATGAGACCGATGAGTATTGG
		Reverse	CGACGTCAGTCGAGTTGTCGTAATG
AT3G01700	AGP11	Forward	TGTCGTAGTTGCCCTTTTGG
		Reverse	CTTGGTTGGGGATTGTTT
AT5G24105	AGP41	Forward	AATTTTCGCCATTTTGTTC
		Reverse	GCCTTGGTCTATCGTTGTTCC
AT5G07420	PME420	Forward	TTGCGACGATAGAGGCAACCAT
		Reverse	TGTGTGCCGCGATCACTCTTAATC
AT3G17060	PME060	Forward	GGTCGCGCAACTTCCATTTTCAAC
		Reverse	GCGCTTTCCTATGGTGTGCTG
AT1G10770	PMEI770	Forward	GGTCAGCACGTGTTACGAGA
		Reverse	CAGACACAGCCGCAGTTAGA
AT2G47050	PMEI050	Forward	CTCTCCGGAATCAAACCAAA
		Reverse	AATTCTCAGCCATGCTCGTT
AT5G50030	PMEI030	Forward	GCCTTGGTCAACAGGGAATACATCG
		Reverse	CGGCCTCAGCCAATGGTAACAG
AT2G26450	PME450	Forward	GTGACCGGTAACAAAAGCCATGC
		Reverse	TTCCGGAACCCCATGACTGTG
AT5G27870	PME870	Forward	AGTCCGATAACGCTGGTGAC
		Reverse	ACGGGTCTGATGTGTCCTTC

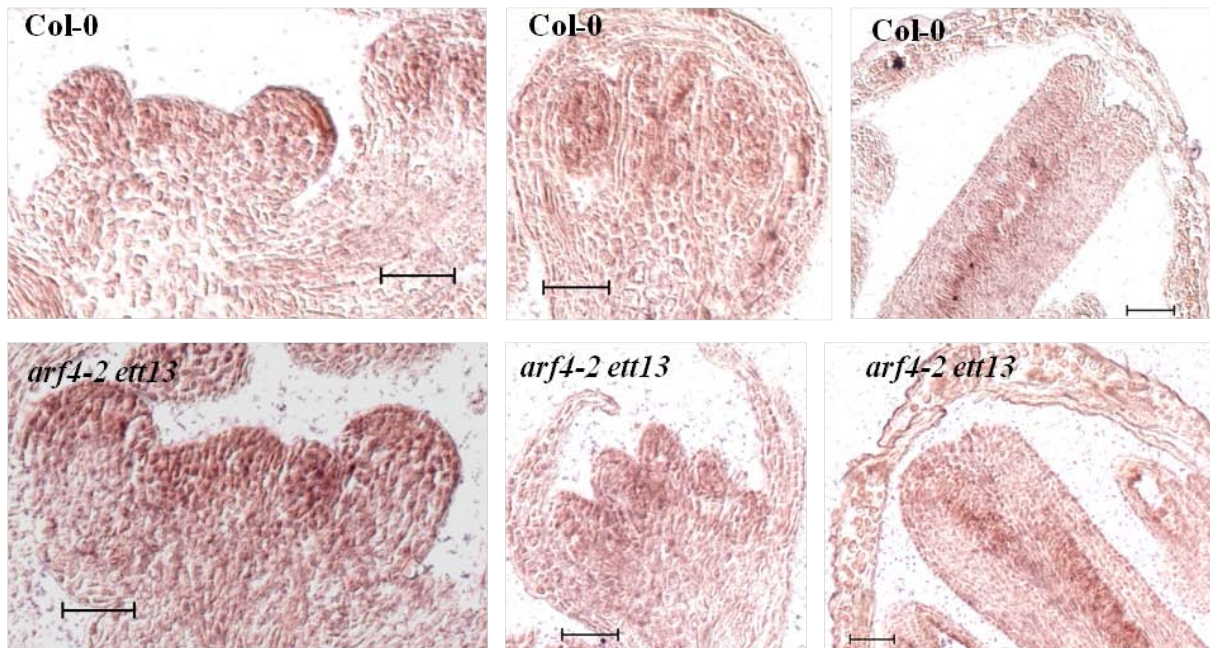
Figure S1: Expression patterns of PME and PMEI regulated by ETT.

In situ hybridizations using *PMEI030* (At5g50030), *PMEI050* (At2g47050), *PMEI770* (At1g10770), *PME060* (At3g17060), *PME420* (At5g07420), *PME450* (At2g26450) and *PME870* (At5g27870) as probes against longitudinal sections of inflorescences from wild-type plants, mutant plants *arf4-2 ett-13* and 35S::ETTm transgenic lines. Scale bars=50µm.

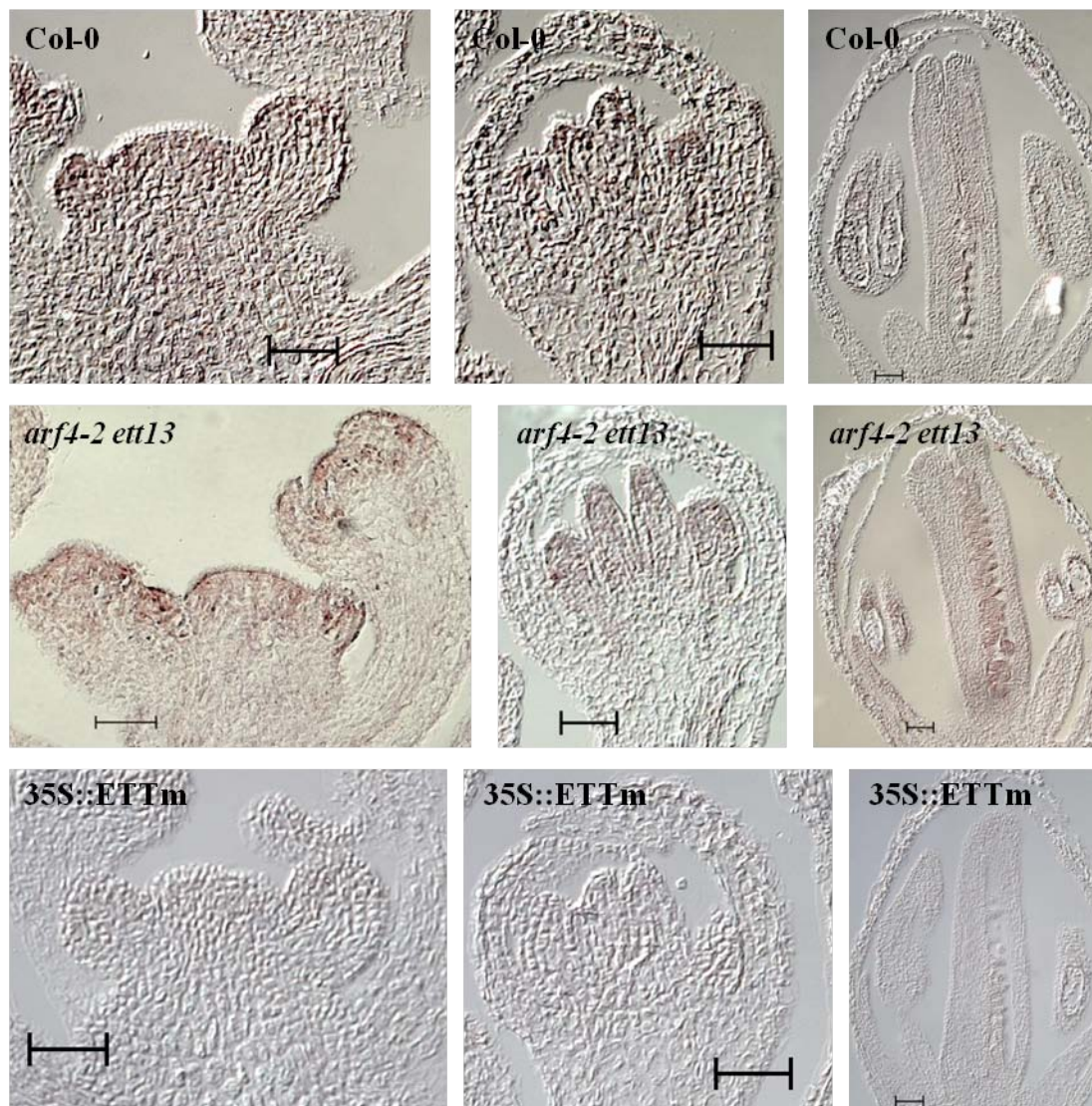
PMEI 030 probe



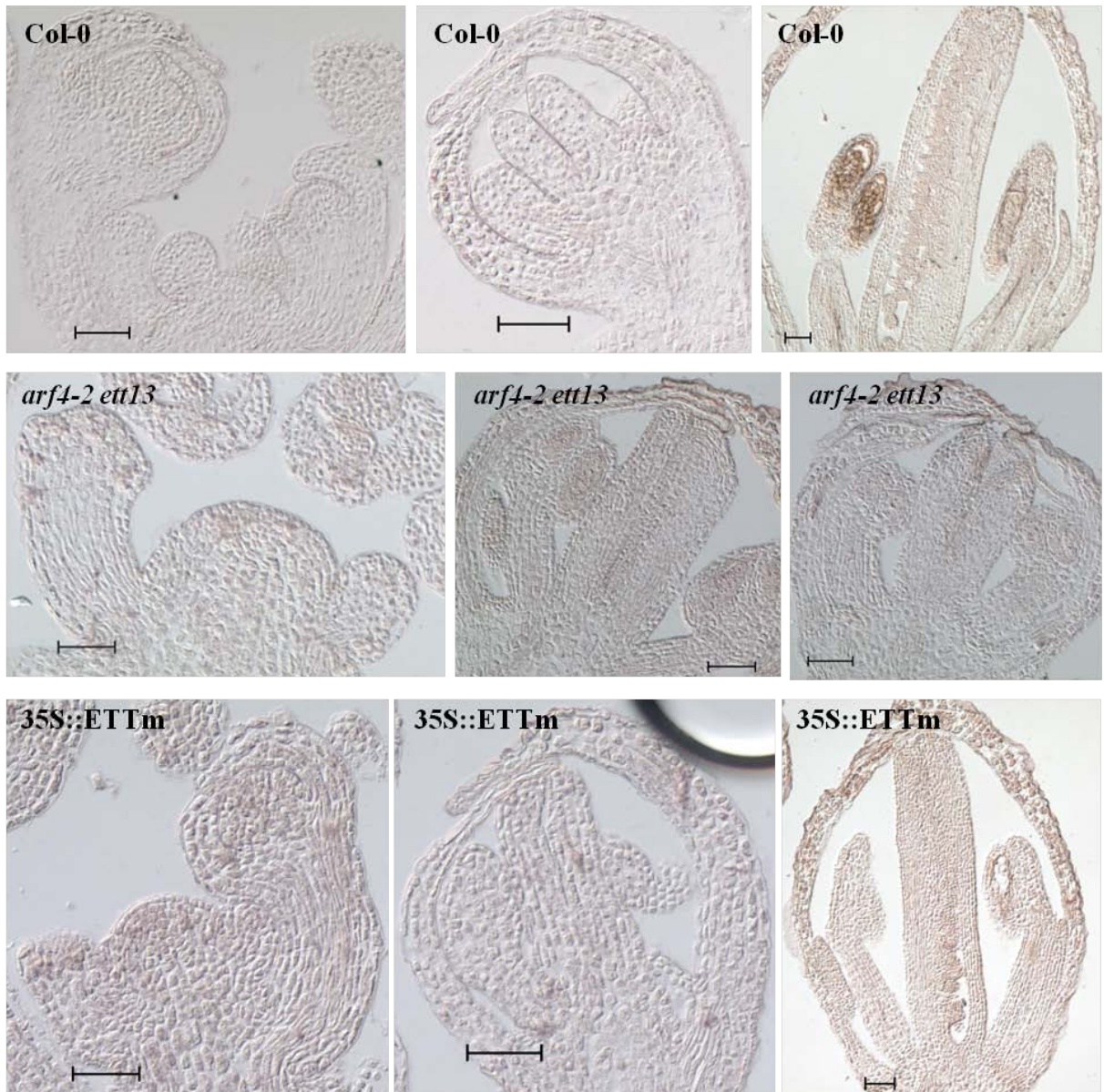
PMEI 050 probe



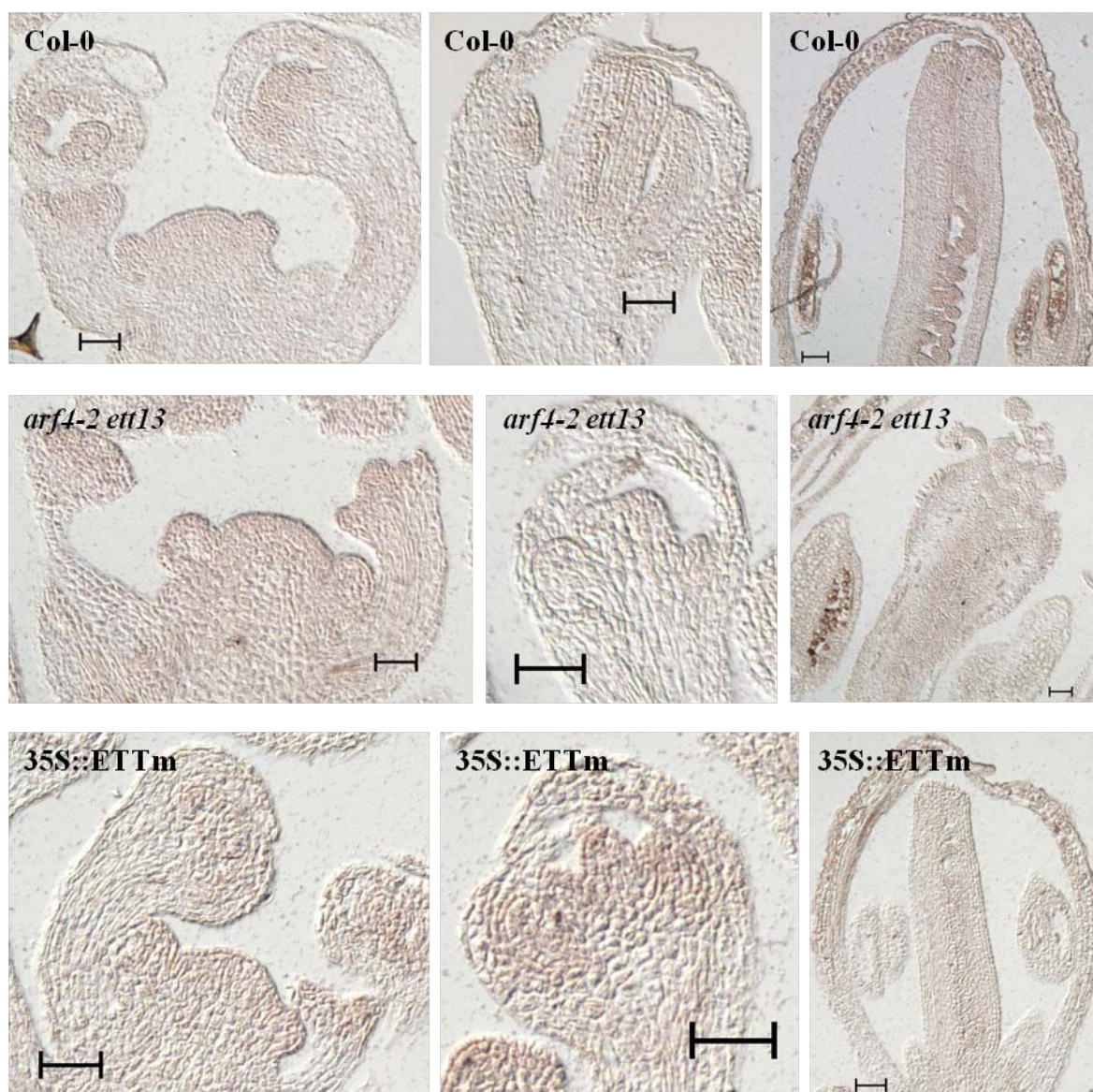
PMEI 770 probe



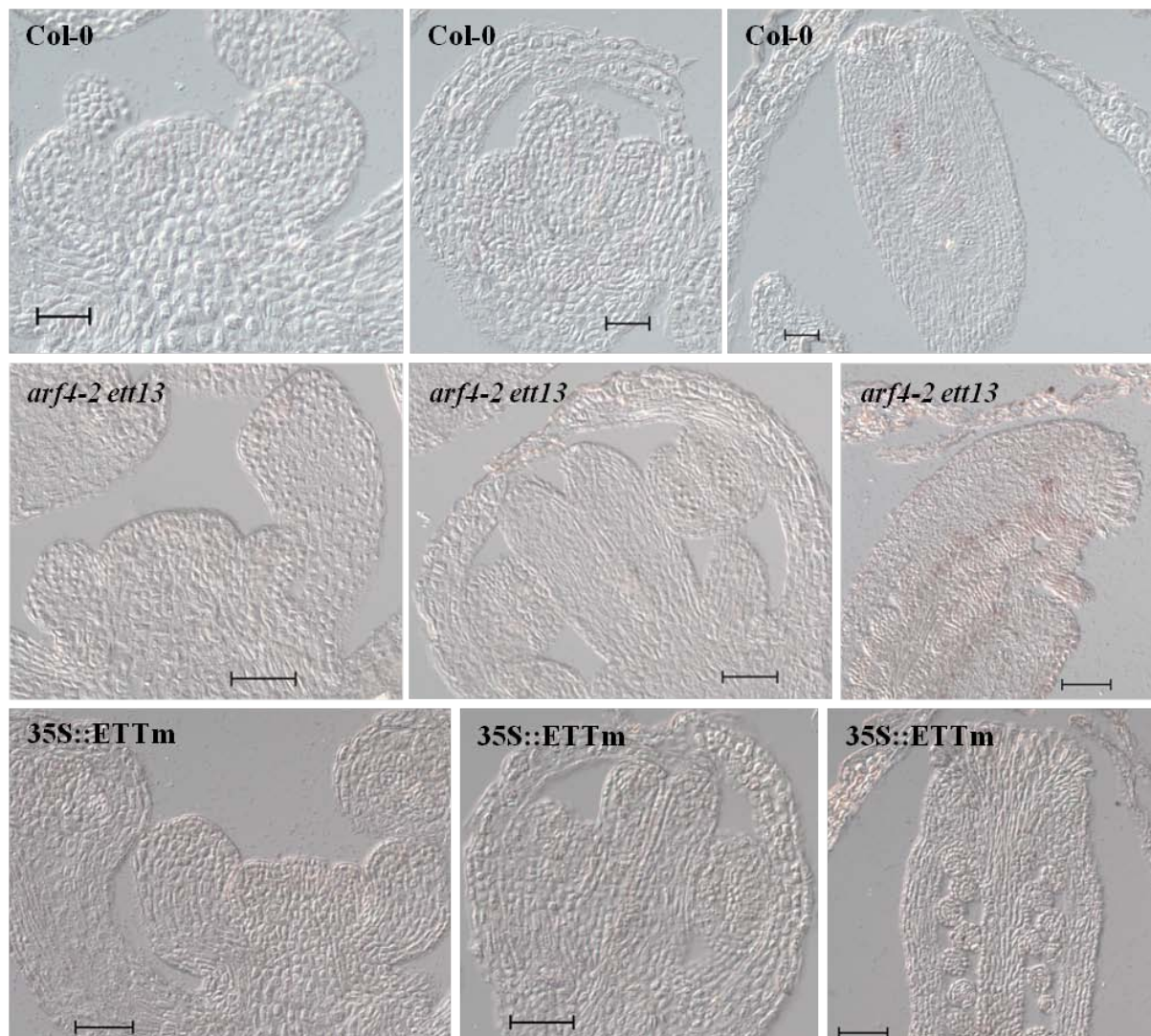
PME 060 probe



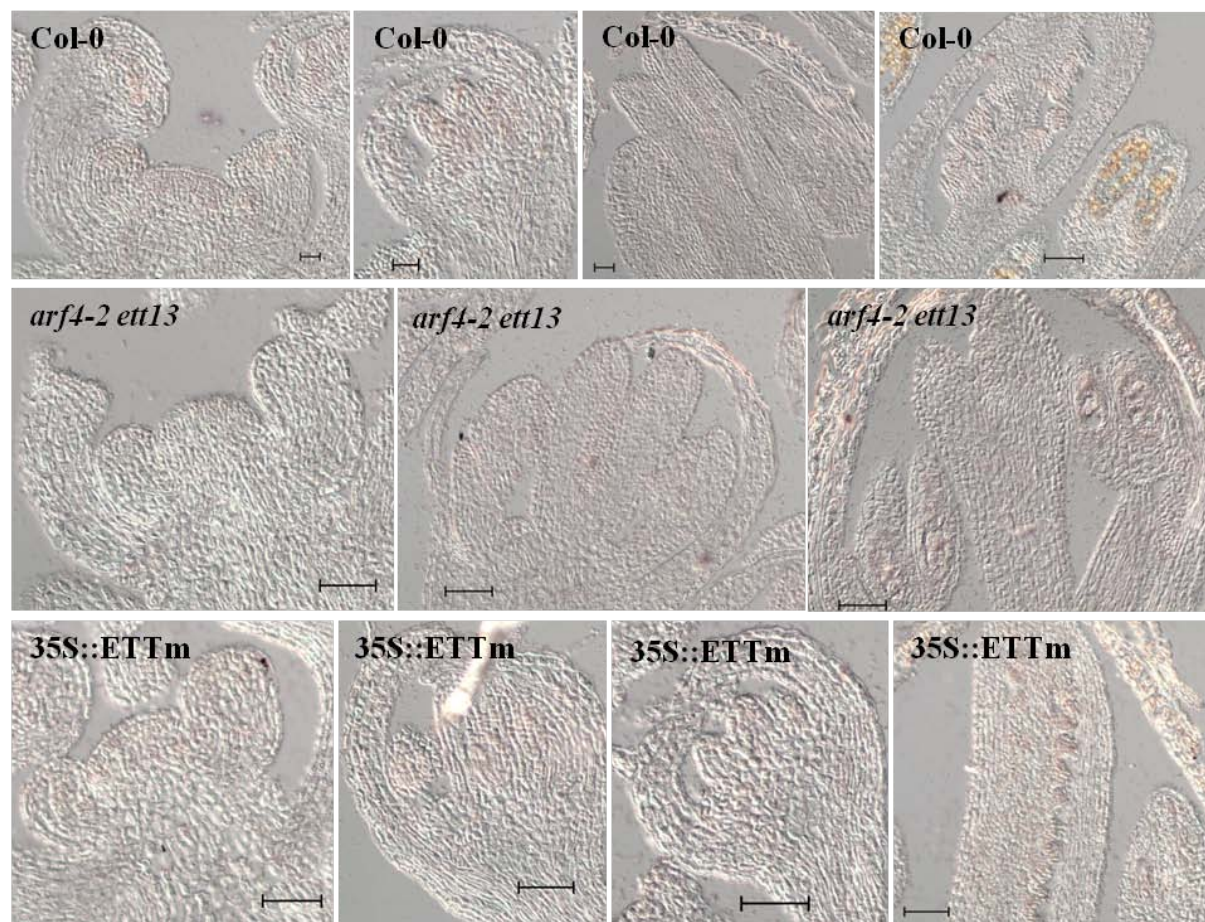
PME 420 probe



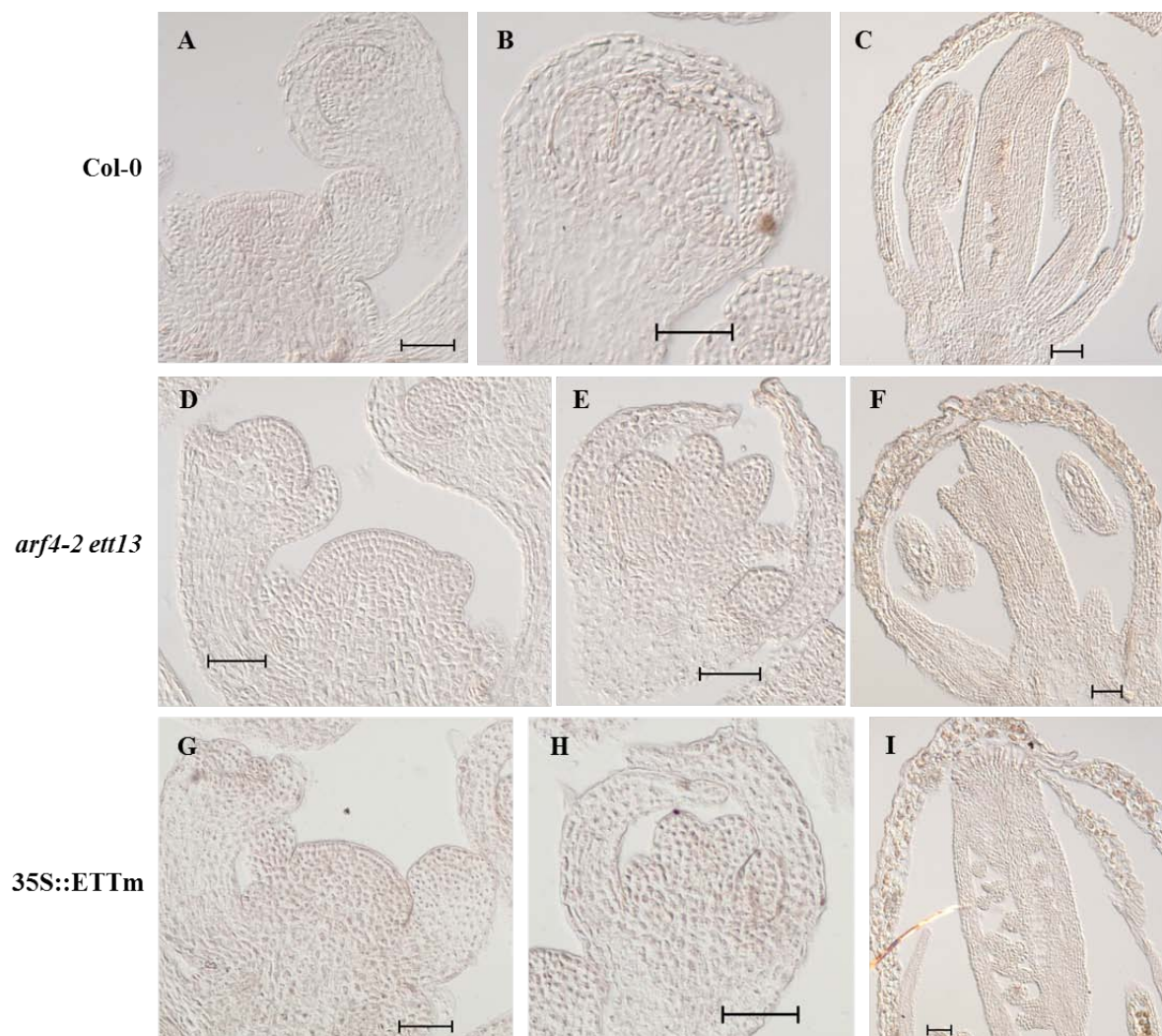
PME 450 probe



PME 870 probe

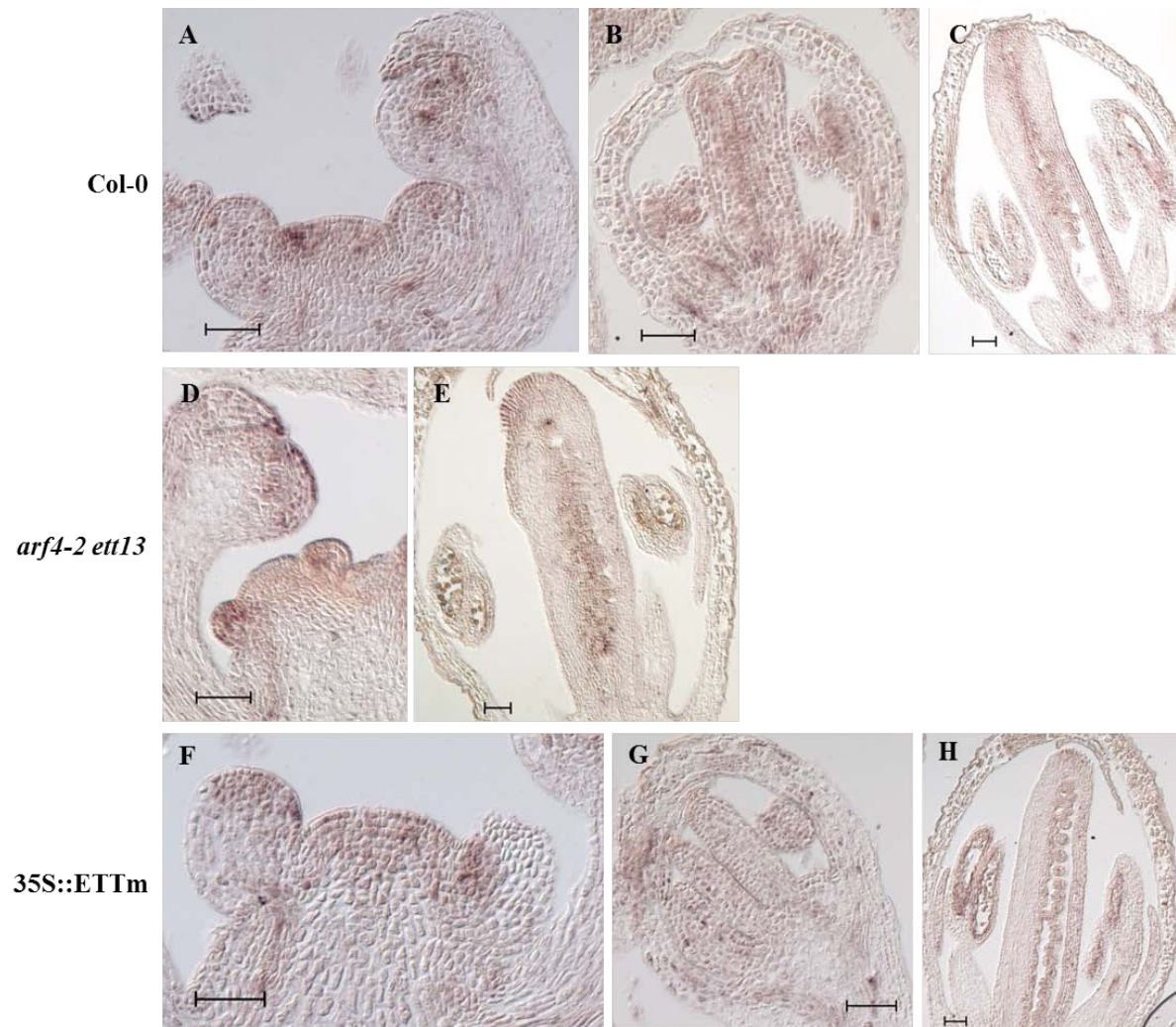


Annexe 2 : Patrons d'expression des gènes cible sur des coupes longitudinales d'inflorescences dans différents fonds génétiques.



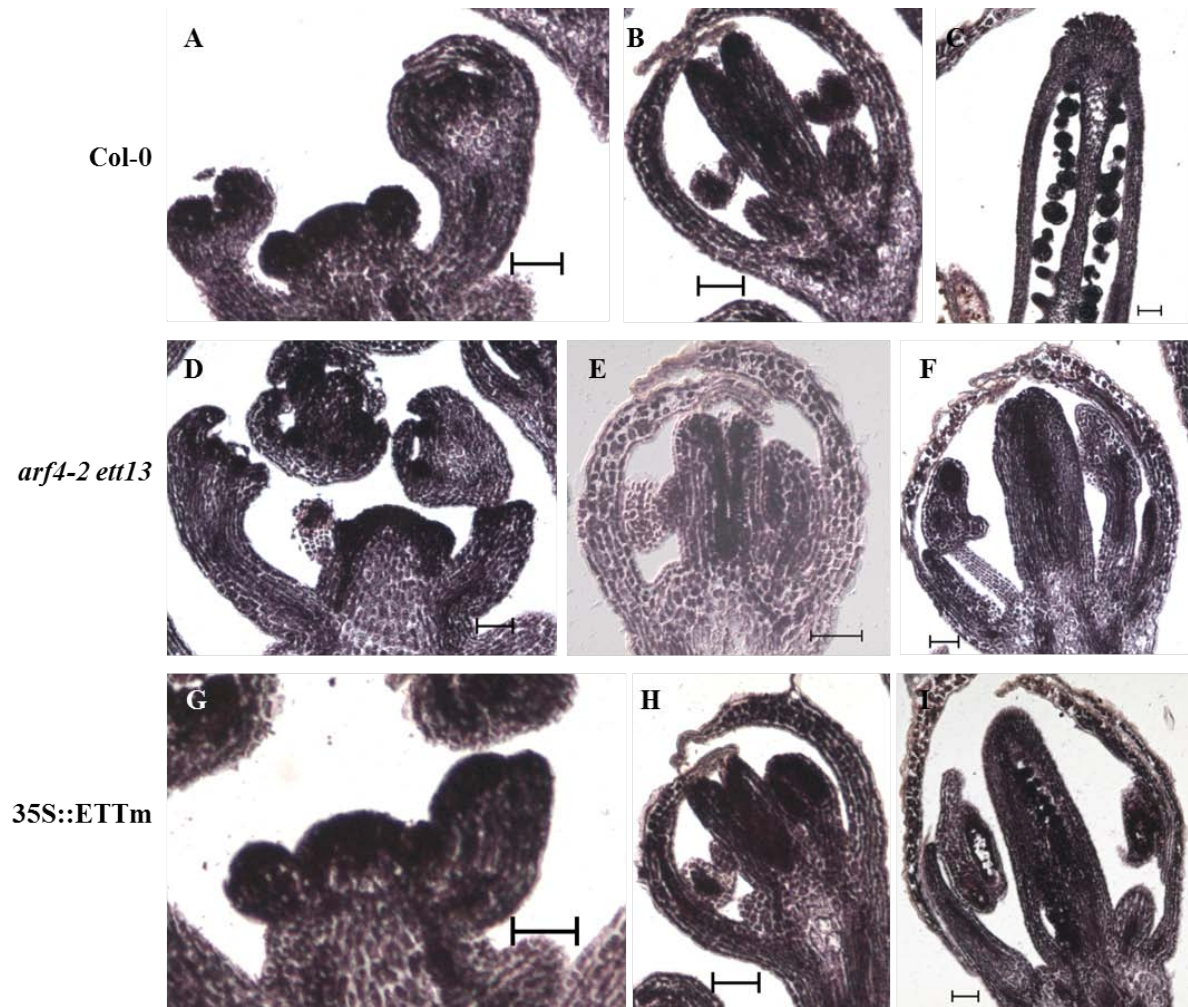
Annexe 2-1 : Patron d'expression de l'*Extensin*.

Hybridations *in situ* avec la sonde de l'*Extensin* dans des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes (A-C) sauvage, (D-F) mutantes *arf4-2 ett-13* et (G-I) transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.



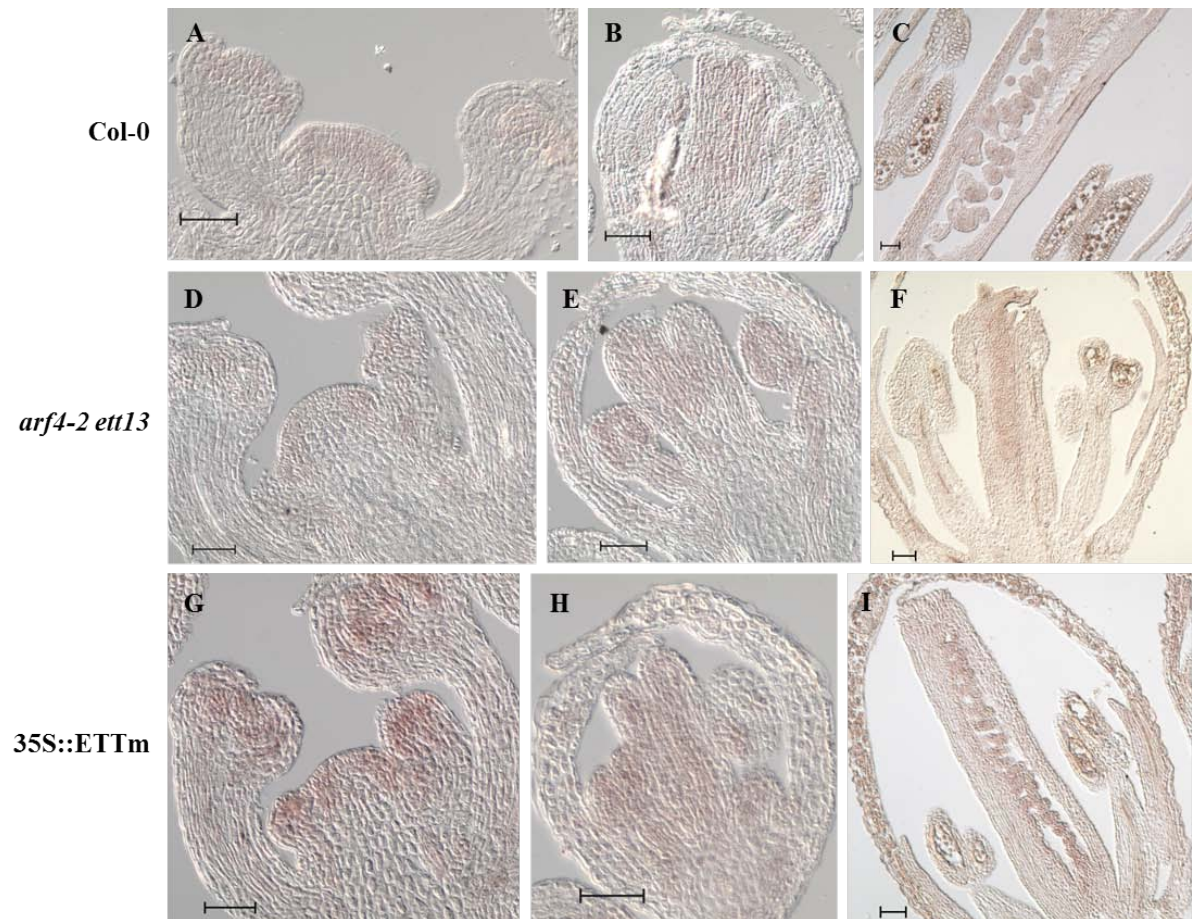
Annexe 2-2 : Patron d'expression d'*ATEXPA1*.

Hybridations *in situ* avec la sonde d'*ATEXPA1* dans des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes (A-C) sauvages, (D-E) mutantes *arf4-2 ett13* et (F-H) transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.



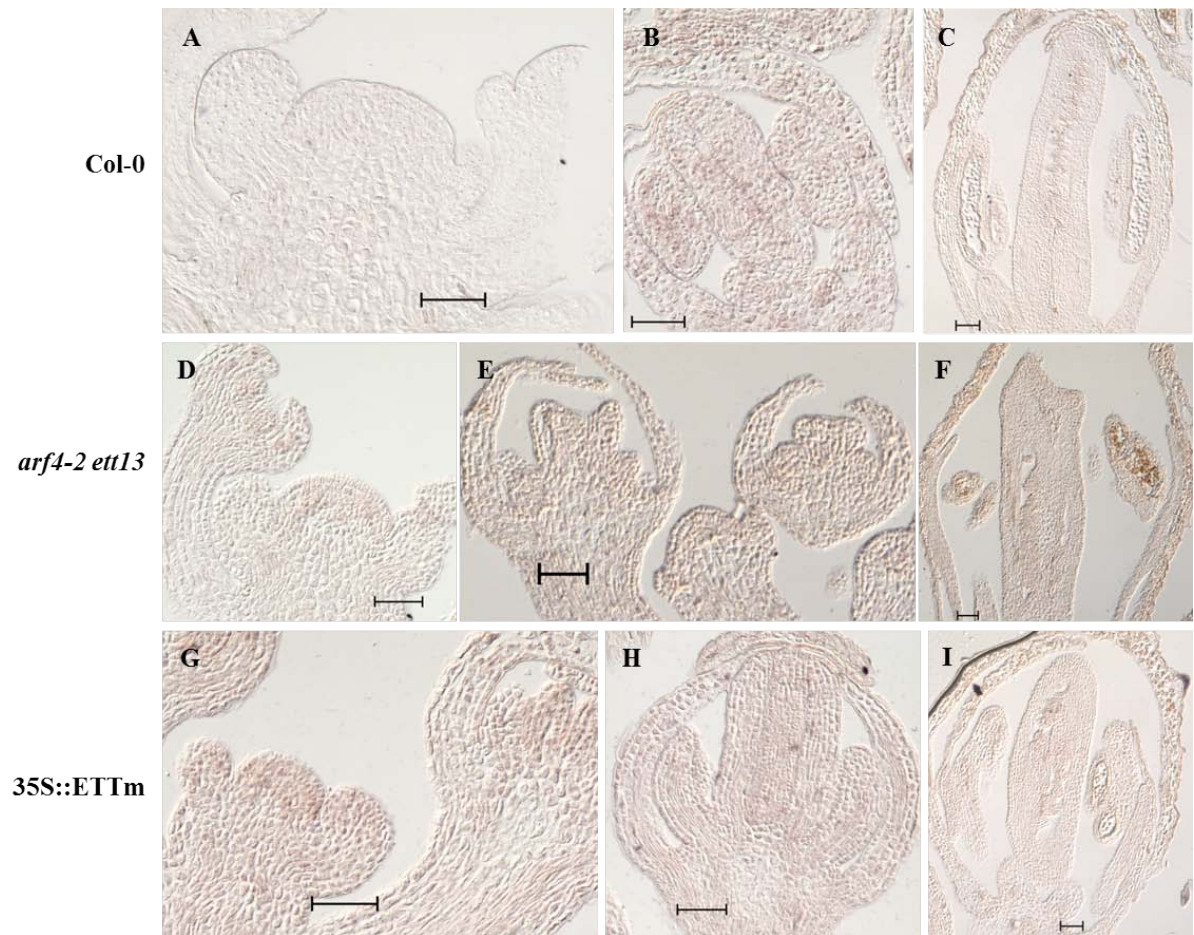
Annexe 2-3 : Patron d'expression d'*AGP11*.

Hybridations *in situ* avec la sonde d'*AGP11* dans des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes (A-C) sauvages, (D-F) mutantes *arf4-2 ett-13* et (G-I) transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.



Annexe 2-4 : Patron d'expression d'AGP41.

Hybridations *in situ* avec la sonde d'AGP41 dans des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes (A-C) sauvages, (D-F) mutantes *arf4-2 ett-13* et (G-I) transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.



Annexe 2-5 : Patron d'expression de *PLL10*.

Hybridations *in situ* avec la sonde de *PLL10* dans des coupes longitudinales d'inflorescences de plantes (A-C) sauvages, (D-F) mutantes *arf4-2 ett-13* et (G-I) transgéniques 35S::ETTm. Les barres d'échelle représentent 50μm.

Annexe 3 : Résultats des mesures du nombre et de la taille des organes floraux.

Col-0			
Taille du gynécée en mn	Taille des valves du gynécée en mn	Taille de silique mature en mn	Taille des valves de la silique en mn
2,358	2,028	12,967	12,555
	na		na
2,254	1,98	12,714	12,371
	na		12,355
1,797	1,452	13,66	13,253
	na		13,503
1,612	1,32	11,346	10,942
	na		na
1,497	1,229	12,662	12,365
	na		12,305
1,857	1,565	12,274	11,968
	1,55		11,772
1,954	1,57	11,939	11,745
	1,618		11,519
1,561	1,319	11,756	11,401
	1,319		11,581
1,823	1,525	12,044	11,61
	na		11,477
1,897	1,532	10,525	10,06
	1,532		10,252
1,974	1,635	11,317	10,943
	na		na
1,504	1,268	11,434	11,061
	na		11,038
1,834	1,399	9,936	9,517
	na		na
1,738	1,385	11,431	10,967
	1,383		11
1,943	1,73	10,322	9,846
	na		9,846
2,272	1,892	13,797	13,553
	na		13,38
1,765	1,484	12,55	12,048
	1,488		12,304
1,914	1,654	13,535	13,236
	na		13,257
2,14	1,824	10,498	9,967
	1,841		10,075
2,691	2,424	10,731	10,412
	na		10,445
2,532	2,22	12,609	12,376
	na		na
2,66	2,339	12,383	11,885
	na		11,978
2,17	1,97	11,934	11,577
	na		11,517
2,232	1,932	12,313	11,827
	na		11,945
2,294	1,994	10,311	9,879
	na		9,813
2,729	2,475	12,314	12,045
	na		11,886
2,16	1,863	10,669	10,262
	na		10,237
2,721	2,295	10,548	10,103
	na		10,148
2,604	2,244	12,781	12,262
	na		12,273
2,416	2,168	9,721	9,399
	2,13		9,428

Taille du gynécée en mn	Taille des valves du gynécée en mn	Taille de silique mature	Taille des valves de la silique en mn
2,709	2,46	9,902	8,159
	na		8,329
1,718	0,863	10,178	9,261
	na		na
1,657	0,84	10,394	9,725
	na		na
2,054	1,677	10,303	9,773
	na		8,959
1,86	0,844	10,6	10,039
	na		na
2,645	2,245	10,069	9,158
	na		9,224
1,612	0,952	9,858	9,229
	na		na
1,653	na	9,458	8,455
	1,255		8,785
1,943	na	10,223	9,521
	1,608		8,975
1,81	0,813	10,066	8,302
	0,809		9,228
1,362	0,844	8,186	7,602
	na		na
1,593	na	8,131	7,717
	0,641		na
1,578	1,158	10,195	9,216
	1,048		na
1,759	na	8,617	7,897
	0,947		7,681
2,23	na	10,214	8,99
	1,667		na
1,984	1,506	9,824	9,739
	1,287		na
2,275	na	9,112	9,102
	1,828		na
2,093	1,71	9,385	7,299
	na		na
2,06	1,811	10,509	9,102
	na		na
2,149	1,605	9,317	8,512
	na		8,409
1,646	0,919	10,755	10,17
	na		na
2,35	1,605	10,168	9,59
	1,363		9,603
2,072	1,607	9,263	8,641
			8,551
2,146	1,776	9,958	9,395
	1,68		9,387
2,197	1,572	11,424	11,076
	na		11,03
1,666	1,225	9,6	9,264
	na		9,123
1,742	1,273	8,664	8,243
	na		8,379
1,51	1,114	10,879	10,488
	na		10,46
1,71	1,282	9,177	8,518
	na		na
1,802	1,533	9,097	8,536
	na		8,599

arf4-2			
Taille du gynécée en mm	Taille des valves du gynécée en mm	Taille de silique mature	Taille des valves de la silique en mm
1,93	1,653	13,893	13,64
	na		13,24
2,234	1,911	13,191	12,807
	na		na
2,077	1,737	15,379	14,963
	1,789		14,99
1,838	1,573	14,348	13,949
	na		13,879
1,921	1,703	13,642	13,393
	na		13,317
1,779	1,443	13,415	13,021
	na		13,005
2,7	2,426	13,458	13,205
	na		13,037
2,343	2,049	13,91	13,674
	2,064		na
2,424	2,098	12,447	12,069
	na		12,047
1,677	1,344	11,111	10,659
	1,344		na
2,189	1,871	9,433	9,213
	na		9,208
2,375	2,052	9,594	9,193
	2,067		na
2,425	2,037	8,877	8,56
	2,014		na
2,267	2,011	9,114	8,8
	na		na
2,281	1,987	13,468	13,077
	na		13,068
2,8	2,372	13,187	12,97
	2,382		12,896
2,34	1,966	12,891	12,494
	na		12,494
2,337	1,98	13,679	13,371
	na		13,286
2,25	1,88	12,997	12,668
	1,891		na
2,383	1,964	12,284	11,966
	na		na
2,087	1,753	12,014	11,53
	na		11,848
2,778	2,398	13,106	12,765
	2,405		na
2,403	2,037	13,483	13,175
	na		13,203
2,295	1,963	13,45	13,134
	na		13,078
2,267	1,864	12,855	12,405
	na		12,532
2,183	1,828	11,405	10,94
	1,837		10,909
1,913	1,653	11,797	11,348
	1,617		11,414
2,1	1,829	12,68	12,255
	1,77		12,343
1,954	1,636	11,641	11,202
	na		11,315
2,161	1,823	10,554	10,274
	1,759		10,198

ett-13 x arf4-2			
Taille du gynécée en mn	Taille des valves du gynécée en mn	Taille de silique mature	Taille des valves de la silique en mn
2,045	0,877	2,39	1,914
	na		na
1,398	0,901	2,201	1,57
	na		na
1,272	na	1,655	0,939
	na		na
1,67	0,841	4,563	2,784
	na		na
1,855	1,177	5,168	3,215
	na		na
1,455	na	2,461	2,184
	na		1,309
1,954	1,163	4,933	na
	na		na
1,625	0,981	3,853	1,864
	na		1,584
1,647	0,801	7,301	3,943
	0,927		na
1,404	0,98	5,764	5,004
	na		na
1,54	na	7,75	6,46
	na		na
1,561	na	4,674	3,282
	na		na
1,315	1,094	5,722	3,348
	0,59		na
1,454	na	6,506	4,679
	na		na
1,614	0,733	7,293	5,091
	na		4,686
1,815	1,268	4,749	na
	na		na
1,446	0,869	6,637	2,851
	na		na
1,939	1,333	7,232	3,075
	1,224		na
1,886	1,176	5,243	1,541
	na		na
2,049	na	4,667	3,484
	1,546		na
2,363	1,012	7,728	4,484
	na		6,369
2,115	1,006	5,052	4,647
	na		na
1,701	na	5,05	3,266
	na		na
2,005	1,152	6,365	5,552
	0,753		5,642
2,372	0,669	6,109	4,104
	na		na
1,175	0,752	8,516	6,973
	na		na
1,53	0,941	7,414	6,184
	na		na
1,428	na	6,458	1,726
	na		na
1,048	na	8,21	7,069
	na		6,436
1,597	0,889	7,114	2,803
	na		na

35SETTm			
Taille du gynécée en mn	Taille des valves du gynécée en mn	Taille de silique mature	Taille des valves de la silique en mn
1,884	1,598	10,275	9,803
	na		9,813
1,651	1,406	11,49	10,789
	1,363		na
2,414	2,071	10,174	9,772
	2,027		9,729
2,064	1,734	11,027	10,338
	1,713		10,21
2,029	1,742	10,835	10,394
	na		na
1,844	1,576	14,077	14,05
	na		na
1,682	1,413	13,402	12,923
	na		na
2,104	1,884	13,848	13,532
	na		13,416
2,156	1,858	13,929	13,677
	na		13,467
2,811	2,385	13,626	13,306
	na		12,922
2,285	1,857	9,681	9,203
	1,874		na
1,92	1,52	11,342	10,852
	1,59		na
1,762	1,419	9,188	8,818
	1,427		8,763
1,763	1,399	10,338	10,022
	na		10,01
2,143	1,747	10,019	9,458
	na		9,55
2,042	1,672	11,307	10,784
	1,72		na
2,293	1,79	10,879	10,496
	na		10,347
2,178	1,803	12,163	11,717
	na		11,763
1,962	1,778	13,2	12,85
	na		12,912
2,221	1,779	11,488	11,141
	na		10,931
2,357	2,044		
	2,045		
2,333	2,046		
	na		
2,041	1,82		
	na		
2,123	1,869		
	1,813		
2,159	1,783		
	na		
2,074	1,707		
	1,805		
2,405	2,175		
	2,184		
2,623	2,307		
	na		
2,405	2,212		
	na		
2,453	2,184		
	na		

rdr6-15			
Taille du gynécée en mn	Taille des valves du gynécée en mn	Taille de silique mature	Taille des valves de la silique en mn
2,204	1,87	12,52	12,016
	1,88		12,085
1,819	1,541	13,766	12,628
	na		na
2,27	2,011	12,858	12,407
	2,065		11,806
2,346	2,014	11,217	10,885
	1,914		10,801
2,631	2,397	11,524	11,156
	2,41		11,237
1,91	1,561	11,5	10,944
	na		na
2,462	2,069	12,57	12,023
	2,094		11,889
2,081	1,76	10,212	9,812
	1,711		9,873
1,877	1,574	11,018	10,574
	1,593		na
2,099	1,572	11,623	11,26
	na		10,942
2,518	2,068	11,005	10,689
	na		na
1,796	1,483	11,184	10,707
	na		10,832
2,569	2,132	11,618	11,208
	na		11,246
2,069	1,7	10,148	9,813
	na		9,617
1,878	1,567	13,756	13,361
	na		13,309
3,278	2,862	12,781	12,505
	na		na
2,502	2,064	9,506	9,068
	2,018		9,212
2,899	2,473	11,339	11,085
	na		10,92
2,988	2,596	9,685	9,322
	na		na
3,406	2,989	12,38	12,039
	na		12,084
2,439	1,937		
	1,914		
2,938	2,562		
	2,567		
2,683	2,309		
	na		
2,815	2,421		
	2,413		
2,471	2,018		
	2,057		
2,609	2,359		
	na		
2,501	2,019		
	2,022		
3,255	2,849		
	na		
2,56	2,164		
	2,201		
2,808	2,422		
	na		

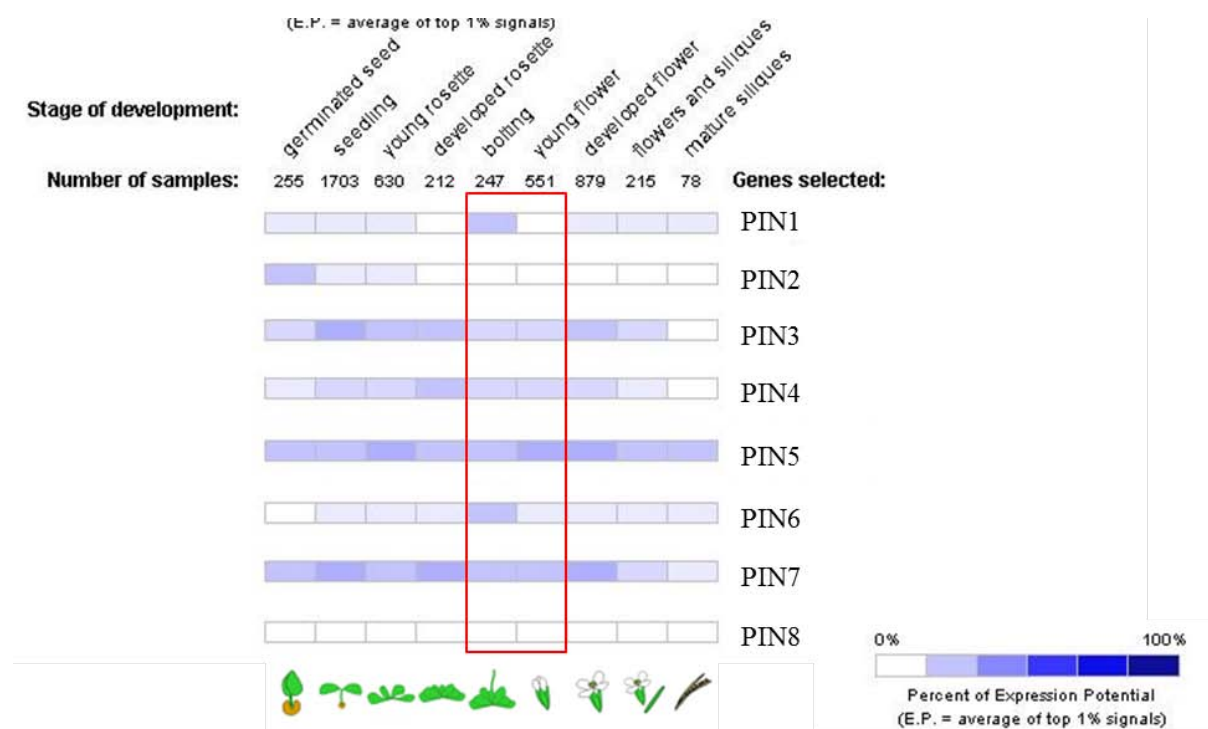
Annexe 4 : Aires (μm^2) des cellules des valves mesurées à partir d'images en microscopie électronique à balayage.

Col-0							
194,20	46,81	66,19	14,56	26,38	16,31	24,81	18,13
643,63	66,75	137,83	47,06	180,54	306,88	418,25	17,06
53,21	71,65	164,96	21,38	157,81	97,69	65,56	106,75
109,50	94,88	183,94	216,31	398,77	102,31	16,06	96,63
40,44	33,94	15,52	65,13	89,34	199,56	29,63	32,56
163,28	88,60	207,00	233,32	303,06	33,25	190,19	26,00
15,46	16,51	26,45	65,25	14,47	66,38	157,19	151,06
172,44	126,00	120,19	108,46	274,75	85,25	133,81	159,00
27,81	20,06	29,63	57,37	54,57	144,25	160,13	232,13
172,38	22,66	81,52	367,25	84,13	39,19	157,44	
22,06	82,00	31,85	24,77	26,31	252,50	20,38	
59,60	264,24	60,06	327,94	323,34	217,00	16,81	
127,94	97,97	30,55	19,99	24,81	15,75	104,63	
395,36	229,44	168,75	282,56	84,56	39,75	49,69	
274,38	26,95	66,99	23,41	24,03	185,63	133,94	
311,36	115,06	245,31	262,25	167,56	41,63	16,06	
182,72	54,63	72,13	108,15	42,53	102,69	22,88	
300,13	58,86	340,60	252,38	306,31	16,44	108,13	
57,06	32,50	12,00	58,44	433,13	19,25	80,81	
344,26	299,75	78,85	132,61	41,88	104,06	96,38	
155,65	133,75	9,19	27,75	37,13	359,00	183,31	
211,38	242,01	17,19	189,11	296,50	62,94	285,19	
9,00	82,88	20,74	26,63	180,06	21,69	17,94	
24,25	246,19	164,81	174,31	88,00	56,13	23,88	
19,56	22,63	142,42	124,67	34,69	300,81	92,56	
26,56	181,04	180,06	234,06	118,06	88,50	151,25	
69,60	30,06	28,81	51,22	188,63	201,25	18,94	
112,63	36,51	216,50	78,69	80,25	554,81	43,00	
112,63	126,50	27,32	21,25	215,75	261,63	77,44	
236,23	190,48	96,69	62,27	27,69	19,19	94,00	

<i>ett-13</i>								
196,40	57,88	13,84	48,24	18,60	27,08	117,92	20,96	96,56
368,68	241,40	348,32	54,28	23,00	167,84	127,12	33,44	8,96
193,20	25,80	24,04	50,76	92,88	18,96	32,04	30,84	20,60
217,80	156,36	165,76	305,00	183,96	205,40	127,44	68,16	58,96
19,92	24,40	80,64	22,76	190,88	34,64	13,52	22,76	15,80
39,92	94,00	294,56	196,88	192,36	353,32	49,28	151,60	27,60
29,16	164,80	49,40	59,20	46,84	36,68	42,52	42,76	48,00
61,04	193,48	118,36	227,48	251,48	114,72	151,04	127,68	120,80
76,08	14,36	65,20	19,12	18,24	19,28	38,72	10,44	183,92
108,24	205,12	251,68	211,48	156,40	113,36	88,56	131,00	37,20
15,28	27,44	53,32	21,60	21,68	30,52	18,36	25,64	16,76
332,48	255,80	162,84	337,28	51,12	93,92	59,64	317,36	124,40
30,08	35,60	10,36	87,12	22,32	13,92	17,40	27,56	70,72
100,28	71,48	24,88	128,68	32,16	95,28	31,76	38,52	348,40
68,60	22,24	10,36	212,72	62,56	32,00	49,00	23,64	444,04
255,96	180,72	19,56	263,84	86,40	59,76	162,64	91,12	266,12
100,40	98,40	47,84	106,08	94,88	20,56	122,32	16,60	443,44
248,40	223,40	102,48	287,52	290,76	24,04	229,60	123,28	245,76
78,52	15,72	180,24	19,32	84,60	15,40	14,68	126,44	101,72
210,36	264,88	320,48	59,48	248,24	102,96	263,16	132,96	195,40
15,36	34,64	219,20	16,96	50,08	28,20	35,16	235,84	20,52
191,12	111,40	309,08	51,56	324,48	108,56	46,72	460,84	69,72
56,52	68,28	262,84	32,28	20,84	59,92	26,08	17,80	
207,12	142,24	342,80	149,92	110,72	101,48	52,68	11,96	
39,52	129,40	115,68	20,68	82,00	38,44	130,84	20,08	
245,76	170,12	236,72	240,44	124,68	107,52	161,44	81,04	
36,60	23,48	44,44	30,52	46,44	9,36	17,56	116,48	
120,56	182,32	89,56	162,96	121,44	20,48	204,92	135,56	
19,52	24,60	10,84	111,20	27,68	66,92	48,36	14,32	
92,68	49,76	33,32	159,92	55,80	123,80	231,28	24,60	
9,20	29,08	14,64	16,24	23,52	15,28	68,80	56,96	
21,44	46,24	122,28	222,12	232,12	279,68	368,44	246,04	
23,08	83,32	16,16	35,88	100,32	152,28	19,72	261,60	
53,96	137,40	76,24	62,20	208,52	219,00	216,00	185,60	
93,92	15,68	35,20	24,56	20,04	14,08	80,80	224,92	
199,92	117,28	44,20	294,96	336,24	64,88	178,24	264,16	
202,48	30,16	15,28	93,60	35,00	8,72	59,80	105,08	
482,00	37,68	110,96	238,40	132,04	39,64	127,56	21,20	
202,48	71,44	26,68	14,88	20,00	45,84	14,72	30,52	
290,72	76,08	60,52	42,72	136,68	89,52	223,96	52,40	

<i>arf4-2 ett-13</i>						
396,79	69,41	71,65	64,44	43,15	50,17	254,49
131,12	260,57	44,14	24,28	227,23	191,78	166,70
9,44	161,48	23,16	236,79	72,89	49,30	121,19
28,25	123,30	103,93	162,73	42,28	12,67	51,66
33,71	95,36	60,35	20,05	24,09	16,45	26,82
241,08	128,27	107,16	28,62	174,89	85,49	34,83
467,50	38,00	19,99	100,21	163,84	17,32	9,69
42,71	29,68	182,66	21,30	45,45	38,37	13,72
38,74	17,51	40,73	33,59	62,95	239,22	15,34
12,91	26,26	23,53	133,48	15,52	17,57	149,75
13,53	347,49	136,96	148,88	123,30	12,17	69,78
194,76	54,08	47,68	279,51	89,28	107,53	18,13
46,19	38,49	48,80	51,34	23,03	84,37	252,44
18,75	106,97	19,31	94,68	15,15	32,72	95,43
48,05	46,32	193,95	18,87	163,22	15,27	
147,27	20,30	97,41	153,79	155,34	87,35	
48,05	103,50	65,75	130,01	136,03	179,74	
11,30	265,79	12,54	71,52	45,69	118,33	
25,14	62,58	14,09	17,32	23,41	48,43	
53,39	23,10	243,87	26,95	188,43	11,18	
24,15	33,59	32,78	117,65	50,29	13,22	
21,79	10,18	35,14	381,27	11,67	231,52	
128,39	21,05	22,23	311,48	29,55	28,62	
188,24	29,24	34,33	303,78	11,61	7,82	
17,94	12,48	71,27	103,68	43,83	12,42	
52,09	62,27	109,77	42,71	59,35	84,50	
82,01	263,80	79,66	13,91	254,98	116,84	
482,78	200,29	169,99	61,90	69,47	25,89	
25,52	22,66	99,71	108,03	9,50	16,51	
16,08	32,10	220,09	38,99	29,24	47,37	

Annexe 5 : Expression des gènes PIN dans la plante d'Arabidopsis.



Expression des gènes PIN dans la plante d'Arabidopsis.

Le niveau d'expression de *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN5*, *PIN6*, *PIN7* et *PIN8* dans les différents tissus de la plante au cours du développement d'Arabidopsis est exprimé en pourcentage du potentiel d'expression et représenté par l'intensité de la couleur violette (d'après Genevestigator).

Annexe 6 : Liste des amorces utilisées en PCR quantitative.

Numéro de gène	Abbréviations	Sens des oligonucléotides	Séquence
AT2G33860	ETT	Sens	tctgtgtctgtggtgtcttcg
		Reverse	atgccacagctccaacaa
AT5G60450	ARF4	Sens	cgctctgcaggggtggttaatgtcc
		Reverse	cccctcccatttagcatcgaaaac
AT3G26650	GAPDH	Sens	cgtttccatcgtctcctccagact
		Reverse	gttctcccgatcctaccgaatcc
AT3G16640	TCTP	Sens	gctcagcgaagaagatcaagctgtc
		Reverse	ccctcccaacaaagaattggaag
AT3G48360	BT2	Sens	gcgagccggttcggttttatc
		Reverse	ctgggtgacctgtagacgtgagac
AT1G04250	IAA17	Sens	cgctgtgacttttgattccaaggag
		Reverse	cgcttgatttttggcaggaaacc
AT1G52830	IAA6	Sens	gagggtgctctcggatatga
		Reverse	caccgttgactcttcacaa
AT5G02110	CYCD7.1	Sens	gttccatcggttcaatggctaadc
		Reverse	tccaattcgccattcgtcacag
AT1G69530	ATEXPA1	Sens	ggctcttcggccagaccttcaca
		Reverse	caaggcctcgtgcaaaatcaagc
AT1G29140	EXTENSIN	Sens	ccacatcaagggtccgtctactg
		Reverse	gggtcactgtctggttctcaga
AT1G14420	Pectate lyase PLL8	Sens	cggctcttacgatcctcatccactt
		Reverse	tgcttttgctgttttacgaccact
AT3G01270	Pectate lyase PLL10	Sens	tgctgatgagaccgatgagtattgg
		Reverse	cgacgtcagtcgagttgtcgtaag
AT3G01700	AGP11	Sens	tgctgtagttgcccttttg
		Reverse	cttggttgggatttggtt
AT5G24105	AGP41	Sens	aattttcgccattttgtgc
		Reverse	gccttggtctatcgtgttcc
AT5G07420	PME420	Sens	ttgcgacgatagaggcaacat
		Reverse	tggtgcccgatcactcttaac
AT3G17060	PME060	Sens	ggtcgcgcaacttccattttcaac
		Reverse	gcgctttccctatgggtgtctg
AT1G10770	PMEI770	Sens	ggtcagcagtggttacgaga
		Reverse	cagacacagccgagttaga
AT2G47050	PMEI050	Sens	ctctcggaaacaaacaaa
		Reverse	aattctcagccatgctcgtt
AT5G50030	PMEI030	Sens	gccttggtcaacagggaatacatcg
		Reverse	cggcctcagccaatggtaacag
AT2G26450	PME450	Sens	gtgaccggtacaaaaagccatgc
		Reverse	ttccggaacccattgactgtg
AT5G27870	PME870	Sens	agtcgataacgctggtgac
		Reverse	acgggtctgatgtgccttc
	VENUS	Sens	aagtcgtgctgcttcattgtg
		Reverse	accctgaagctgatctgcac

Annexe 7 : Liste des amorces utilisées pour faire les sondes.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
AGP11-atg-F	ATGGCACGTCTATTTGTCGT
T7-AGP11-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAGAGAGAGAAGATGAAGAATCC
AGP41-atg-F	ATGTCGGGCTCGAGGCTTTT
T7-AGP41-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAATGGATGAGATATGTGAGGACC
Extensin-atg-F	ATGGCCAAATTCTTCATTGT
T7-Extensin-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAGAAGGTGACGTCAGGGA
ATEXPA1-atg-F	ATGGCTCTTGTCACCTTCTT
T7-ATEXPA1-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAAGCACTCGAAGCACCAC
PLL8-atg-F	ATGGCAGCAGCTTTCTTGAA
T7-PLL8-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAGCAAGCTTCACCAAGTTTGC
PLL10-atg-F	ATGGAGACGGCTAGGCTTTT
T7-PLL10-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAGCATGCTTTTCCGACCC
PME450-atg-F	ATGGCGTTTCAGGATTTTGA
T7-PME450-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAAGCATCATAAAGACCCA
PME060-atg-F	ATGGGTCATCGAACAAGAAT
T7-PME060-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTAAAACCTTTCTGAAGCC
PME420-atg-F	ATGGGTTACATATCTCTAGCCC
T7-PME420-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAGTAAGCGGGAGGAGGTA
PME870-atg-F	ATGTCATATGGATACGACGATG
T7-PME870-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAACCGATTGAGCTTTGTG
PMEI770-atg-F	ATGGCGGGCCGCGACACATT
T7-PMEI770-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCATCTAATCAATGTAGACAACGCC
PMEI050-atg-F	ATGAACACTCCAATAAACTCGCC
T7-PMEI050-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAATAGTAGTAAAAGGACAAAGG
PMEI030-atg-F	ATGGCTTCTTACTCCGGTTG
T7-PMEI030-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAAGCACGACGATGTAAGT
BT2-atg-F	ATGGAAGCTGTTCTTGTCGC
T7-BT2-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAAACCCCTTGCTTGTTTC
CYCD7-atg-F	ATGGATAATCTACTCTGCGAAG
T7-CYCD7-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTAAATGTAATTTGACATTTCAAT
IAA6-atg-F	ATGGCAAAGGAAGGTCTAGCACTCG
T7-IAA6-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTTAATCTTGCTGGAGACCAAAACCAG
IAA17-atg-F	ATGATGGGCAGTGTCGAGCTGAA
T7-IAA17-R	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTCAAGCTCTGCTCTTGCACTTCTCC

La séquence de l'extension T7 est : TGTAATACGACTCACTATAGGGC

Annexe 8 : Liste des amorces utilisées pour le BiFC.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
CRCatg	caccatgaacctagaagagaaaccaacca
CRCstop	tcacttcttctcaccgaatccaag
CRCnostop	cttcttctcaccgaatccaagcca
FILatg	caccatgtctatgtcgtctatgtcctccc
FILstop	ttaataaggagtcacaccaacgtta
FILnostop	ataaggagtcacaccaacgttagca
YAB3atg	caccatgtcgagcatgtccatgtcgtcct
YAB3stop	ctagttatggggccacccaacgttg
YAB3nostop	gttatggggccacccaacgttggca
LuHatg	caccatggctcagagtaattgggaagctg
LuHstop	ctacttccaaatctttacggatttg
LuHnostop	cttccaaatctttacggatttgca
ETTatg	caccatgggtgggtttaatcgatctgaacg
ETTstop	tcagagagcaatgtctagcaacatgtctc
ETTnostop	gagagcaatgtctagcaacatgtctctca
ARF4atg	caccatggaatttgactgaatactgaga
ARF4stop	tcaaaccctagtgttagtagagaag
ARF4nostop	aaccctagtgttagtagagaagaat

L'extension "cacc" permet d'orienter le fragment dans le plasmide pENTR/D/TOPO

RÉSUMÉ

L'auxine est une hormone végétale impliquée dans de nombreux processus développementaux. En particulier, son importance a été montrée dans le développement du gynécée (Nemhauser et al, 2000). Dans les cellules, la réponse à l'auxine dépend majoritairement de deux familles protéiques : les ARF (Auxin Response Factors) et les Aux/IAA. Les ARFs sont des facteurs de transcription qui régulent la transcription des gènes de réponse à l'auxine, tandis que les Aux/IAA inhibent l'activité transcriptionnelle des ARFs par dimérisation. En présence d'auxine, les Aux/IAA sont dégradés via le protéasome et libèrent les ARFs. Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte 23 ARFs et de nombreux gènes activés ou réprimés par l'auxine. Cependant, le rôle exact de chaque ARF dans la régulation des gènes cibles ainsi que leur implication dans les différents processus développementaux ne sont pas clairs. Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur deux proches paralogues *ETTIN/ARF3* et *ARF4* impliqués dans le développement du gynécée (organe reproducteur femelle). En effet, chez des mutants *ettin*, le gynécée présente un défaut de polarité apico-basale et une réduction de la taille des ovaires, et ce phénotype est accentué chez les double mutants *ettin arf4*.

Afin de comprendre le rôle d'ETT dans le développement du gynécée, ses cibles directes ont été identifiées dans l'équipe. Parmi ces cibles, 2 catégories ont retenu notre attention : des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine et des gènes codant des enzymes de remodelage de la paroi. Mon projet a consisté à essayer de comprendre l'implication de ces régulations transcriptionnelles dans le développement du gynécée. Dans une première partie, j'ai étudié la signalisation de l'auxine dans le développement du gynécée, puis l'implication d'*ETTIN* (*ETT*) dans cette signalisation. Pour cela, j'ai utilisé un nouveau capteur d'auxine développé dans notre équipe. Nos résultats, bien que préliminaires, nous ont permis de donner un éclairage nouveau à une hypothèse formulée depuis plus de 10 ans sur la répartition de l'auxine au cours des stades précoces du développement du gynécée. Dans une deuxième partie, j'ai confirmé la répression par ETT, des cibles identifiées. De plus, la répression par ETT des gènes codant les inhibiteurs de pectine méthylestérases (PMEI) nous a conduits à mesurer le taux de méthylation des pectines dans les gynécées de plantes présentant différents niveaux d'ETT. Ceci nous a permis de montrer qu'ETT induit la déméthylation des pectines en inhibant les inhibiteurs de pectine méthylestérase (PMEI). Des analyses fonctionnelles sont en cours afin de confirmer le rôle de ces régulations transcriptionnelles dans la fonction d'ETT. De plus, j'ai montré qu'ETT et ARF4 agiraient de façon redondante pour contrôler positivement la croissance du gynécée. Dans une troisième partie, j'ai abordé rapidement, l'analyse des domaines fonctionnels du facteur de transcription CRABS CLAW, également impliqué dans le développement du gynécée. En conclusion, mes travaux de thèse apportent une nouvelle vision sur le rôle de la signalisation de l'auxine au cours du développement du gynécée et montrent l'importance du remodelage de la paroi dans la morphogénèse des organes.